

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 946**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/541** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2014 PCT/US2014/018620**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014 WO14134139**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2014 E 14756548 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2962105**

54 Título: **Métodos y reactivos para la determinación de analitos isoméricos**

30 Prioridad:

**28.02.2013 US 201313780305**

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

**29.11.2018**

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.**

**(100.0%)**

**511 Benedict Avenue  
Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**WEI, TIE, Q. y  
BAHAR, IZAK**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 691 946 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

Métodos y reactivos para la determinación de analitos isoméricos

## Antecedentes

5 La presente invención se refiere a métodos para la determinación de la presencia y/o cantidad de cada uno de los dos analitos isoméricos 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> y 3-epi 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> en una muestra que se sospecha que contiene los analitos isoméricos.

10 Muchos compuestos de molécula pequeña o haptenos tales como, por ejemplo, fármacos y vitaminas, existen en formas isoméricas, de las cuales solo una forma es activa. Con el fin de obtener una medición precisa de la forma activa de un analito, debe abordarse la presencia del isómero no activo del analito. Las mediciones de ambas formas isoméricas de un analito, es decir, formas activas y no activas, pueden conducir a imprecisiones que pueden ser perjudiciales para un individuo dependiendo de la función de la forma activa del analito. La evaluación precisa del nivel de cada uno de un par de analitos isoméricos en muestras biológicas es importante, especialmente cuando solo uno de los isómeros es activo y las mediciones que incluyen la cantidad del isómero no activo distorsionan el nivel del analito en una muestra. Por ejemplo, la medición de los niveles de vitamina D en muestras biológicas es importante puesto que la deficiencia de vitamina D está relacionada con una serie de trastornos en mamíferos. En lactantes, por ejemplo, las mediciones de vitamina D que incluyen cantidades de isómeros 3-epi pueden conducir a una evaluación imprecisa de los niveles de vitamina D en el lactante, lo que a su vez puede conducir a una falta de complementación adecuada. Es importante medir la forma activa de la vitamina D de manera que un infante pueda recibir la terapia con vitamina D adecuada, si es necesario.

20 El término "vitamina D" se refiere a un grupo de secoesteroides solubles en grasa. En los seres humanos, la vitamina D es única porque puede ingerirse como colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>) o ergocalciferol (vitamina D<sub>2</sub>) y porque el cuerpo también puede sintetizarla (a partir de colesterol) cuando la exposición al sol es adecuada. Debido a esta última propiedad, la vitamina D es considerada por algunos una vitamina dietética no esencial, aunque la mayoría la considera un nutriente esencial. La vitamina D tiene un papel fisiológico importante en la regulación positiva de la homeostasis del ion calcio. La vitamina D<sub>3</sub> es la forma de la vitamina sintetizada por los animales. También es un complemento habitual añadido a los productos lácteos y ciertos productos alimentarios como lo es la vitamina D<sub>2</sub>.

30 La vitamina D<sub>3</sub> tanto dietética como intrínsecamente sintetizada debe experimentar la activación metabólica para generar metabolitos bioactivos. En seres humanos, la etapa inicial de la activación de la vitamina D<sub>3</sub> se produce principalmente en el hígado e implica la hidroxilación para formar el metabolito intermedio 25-hidroxicolecalciferol (también denominado calcidiol, calcifediol, 25-hidroxicolecalciferol o 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>). El calcidiol es la forma principal de la vitamina D<sub>3</sub> en el sistema circulatorio. La vitamina D<sub>2</sub> también experimenta una activación metabólica similar a la 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub>. En conjunto, estos compuestos se denominan 25-hidroxivitamina D (abreviado 25(OH)D) y son los principales metabolitos que se miden en suero para la determinación del estado de vitamina D; 25(OH)D y sus epímeros son prehormonas que deben convertirse en 1,25(OH)D para ejercer funciones biológicas. La comparación de la bioactividad de 1,25(OH)D frente a la de 3-epi-1,25(OH)D es compleja.

40 Los compuestos de vitamina D 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> y 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> son epiméricos en la posición 3, designándose los epímeros 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> y 3-epi-25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> y 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> y 3-epi-25-hidroxivitamina D<sub>2</sub>, respectivamente. Solo uno de los epímeros de cada uno de estos compuestos epiméricos, en concreto, 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> y 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub>, respectivamente, están activos. Las estructuras para los epímeros de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> y 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> se exponen en la Fig. 1. La patente de los EE.UU. N.º 2009/0137056 se refiere a métodos basados en espectrometría de masas de detección de la presencia o cantidad de metabolitos de dihidroxivitamina D, incluyendo epímeros de la vitamina-D<sub>3</sub>, en una muestra.

Existe la necesidad de reactivos y métodos para determinaciones precisas y sensibles de concentraciones de formas epiméricas de la vitamina D.

## 45 Sumario

Los principios que se describen en el presente documento se refieren a métodos de determinación en una muestra de una cantidad de un primer analito isomérico y un segundo analito isomérico. En el método, se determinan un primer valor de medición y un segundo valor de medición. Para la determinación del primer valor de medición, se mide una cantidad total del primer analito isomérico y el segundo analito isomérico mediante la realización de un ensayo en una porción de la muestra usando un primer anticuerpo que tiene una afinidad de unión para cada uno de entre el primer analito isomérico y el segundo analito isomérico de al menos aproximadamente 10<sup>7</sup> litros/mol. Para la determinación del segundo valor de medición, se mide una cantidad del segundo analito isomérico mediante la realización del ensayo en una porción de la muestra usando el primer anticuerpo para obtener un segundo valor de medición, en el que un segundo anticuerpo que tiene una afinidad de unión por el primer analito isomérico de

aproximadamente  $10^6$  a aproximadamente  $10^{12}$  litros/mol y una afinidad de unión por el segundo analito isomérico de menos de aproximadamente  $10^4$  litros/mol se emplea en exceso para bloquear la unión del primer analito isomérico al primer anticuerpo. El segundo valor de medición se compara con una cantidad del segundo analito isomérico en la muestra y el segundo valor de medición se resta del primer valor de medición para obtener un valor resultante, que se equipara a una cantidad del primer analito isomérico en la muestra. Los dos analitos isoméricos son 25-hidroxitamina D<sub>3</sub> y 3-epi 25-hidroxitamina D<sub>3</sub>.

### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una representación de las fórmulas químicas para las formas epiméricas de 25-hidroxitamina D<sub>3</sub> y 25-hidroxitamina D<sub>2</sub>.

La Fig. 2 es un gráfico que representa las mediciones de vitamina D de 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>3</sub> con y sin la adición de un segundo anticuerpo de acuerdo con los ejemplos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento.

La Fig. 3 es un gráfico que representa las mediciones de vitamina D de 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>3</sub> con y sin la adición de un segundo anticuerpo de acuerdo con los ejemplos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento.

### Descripción detallada de realizaciones específicas

#### Análisis general

Los métodos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento minimizan la reactividad cruzada y miden una cantidad de uno de los dos isómeros de un analito donde uno de los isómeros o su producto metabólico es potente y el otro o su producto metabólico no lo es. El término "potente" se refiere al grado de actividad de un analito con respecto a una función particular, que puede ser, por ejemplo, una función biológica tal como, por ejemplo, el metabolismo óseo. Por ejemplo, la actividad biológica de una sustancia se relaciona con la capacidad de la sustancia para potenciar o suprimir una función biológica tal como, por ejemplo, mantener niveles apropiados de minerales y sales en un sujeto, una función celular. La vitamina D mantiene niveles apropiados de calcio y fosfato en un sujeto, lo que se relaciona con la homeostasis del calcio y el metabolismo óseo.

Los métodos incluyen determinar en una muestra una cantidad de un primer analito isomérico y un segundo analito isomérico. Se determinan un primer valor de medición y un segundo valor de medición. El primer valor de medición representa una cantidad total del primer analito isomérico y el segundo analito isomérico. El segundo valor de medición representa una cantidad del segundo analito isomérico solamente. El segundo valor de medición se resta del primer valor de medición para obtener un valor resultante y el valor resultante se iguala a una cantidad del primer analito isomérico en la muestra.

En métodos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento, se utilizan al menos dos porciones de una muestra que se ha de analizar. Se realiza un ensayo en una primera porción de la muestra que se sospecha que contiene al menos dos formas isoméricas de un analito usando un anticuerpo (primer anticuerpo) que se une a ambas formas isoméricas del analito. El primer anticuerpo presenta una afinidad de unión de ensayo suficiente para cada uno de entre el primer analito isomérico y el segundo analito isomérico.

La frase "afinidad de unión de ensayo" se refiere a la fuerza con la que un anticuerpo se une a un analito correspondiente para producir un complejo de anticuerpo unido al analito.

La frase "afinidad de unión de ensayo suficiente" significa que la afinidad de unión de un anticuerpo por un analito es la que produce un complejo detectable en una cantidad suficiente para obtener una señal de ensayo que da como resultado una determinación precisa y sensible del analito. La afinidad de unión del primer anticuerpo es lo suficientemente fuerte para formar complejos detectables del primer anticuerpo y cada uno de entre el primer analito isomérico y el segundo analito isomérico donde los complejos detectables representan con precisión la cantidad del primer analito isomérico y el segundo analito isomérico en la muestra una vez que el sistema de ensayo y el instrumento han sido sometidos a calibración adecuada y se han aplicado cualesquiera factores de corrección para el reconocimiento de anticuerpos de uno o ambos analitos isoméricos. Este ensayo en la primera porción de la muestra mide la cantidad o concentración de ambas formas isoméricas de un analito en una muestra.

El mismo ensayo se realiza en una segunda porción de la misma muestra usando tanto el primer anticuerpo que se une a ambas formas isoméricas del analito como un segundo anticuerpo que se une a una de las formas isoméricas (primera forma isomérica) pero que no presenta sustancialmente ninguna afinidad de unión para la otra forma isomérica (segunda forma isomérica) dejando la segunda forma isomérica libre para la detección por el primer anticuerpo en el ensayo realizado en la segunda porción. El segundo anticuerpo que se une a la primera forma isomérica, pero no a la segunda forma isomérica, presenta una afinidad de unión de ensayo insuficiente para el primer analito isomérico. En algunos ejemplos, el segundo anticuerpo que se une a una de las formas isoméricas,

pero no a la otra forma isomérica, se une a la forma isomérica activa, pero no a la forma isomérica no activa. Este ensayo en la segunda porción de la muestra mide la concentración de solo una de las formas isoméricas del analito, es decir, el segundo analito isomérico en la descripción anterior. Los valores de señal obtenidos pueden usarse para la determinación de la concentración de analito total y la concentración de cada una de las dos formas isoméricas del analito.

La frase "afinidad de unión de ensayo insuficiente" significa que la afinidad de unión del segundo anticuerpo por un analito isomérico es menor que la afinidad de unión del primer anticuerpo por el analito isomérico. En algunos ejemplos, la frase "afinidad de unión de ensayo insuficiente" significa que la afinidad de unión del segundo anticuerpo por un analito isomérico no es lo suficientemente grande para formar complejos detectables entre el segundo anticuerpo y el primer analito isomérico y, por tanto, ningún complejo detectable representa de forma precisa la cantidad del primer analito isomérico. El segundo anticuerpo, cuando se usa en exceso, presenta una afinidad de unión suficiente para que el primer analito isomérico bloquee la unión del primer anticuerpo al primer analito isomérico en el ensayo en la segunda porción de la muestra. La afinidad de unión del segundo anticuerpo por la primera forma isomérica del analito es demasiado baja para generar complejos de segundo anticuerpo y primer analito isomérico de manera que se produzca suficiente señal para la detección precisa del primer analito isomérico en el ensayo empleado.

La frase "no presenta sustancialmente ninguna afinidad de unión" por la segunda forma isomérica significa que sustancialmente no se forman complejos detectables entre el segundo anticuerpo y la segunda forma isomérica del analito.

Debe observarse que, si el resultado del ensayo en la segunda porción de la muestra es sustancialmente equivalente a cero, entonces el resultado obtenido del ensayo en la primera porción de la muestra representa la concentración de solo una de las dos formas isoméricas del analito puesto que la otra forma isomérica del analito no se detecta en el ensayo en la segunda porción de la muestra. En una circunstancia de este tipo, no sería necesario realizar ensayos en dos porciones de la muestra en cuestión puesto que los resultados de los métodos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento indican que solo una de las formas isoméricas del analito contribuye a la señal obtenida en el ensayo en la primera porción de la muestra. Por otro lado, si el resultado del ensayo en la segunda porción de la muestra no es sustancialmente equivalente a cero, entonces el resultado obtenido del ensayo en la primera porción de la muestra representa la concentración de ambas formas isoméricas del analito puesto que la otra forma isomérica del analito se detecta en el ensayo en la segunda porción de la muestra. En una circunstancia de este tipo, sería necesario realizar ensayos en dos porciones de la muestra en cuestión, puesto que los resultados de los métodos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento indican que las dos formas isoméricas del analito contribuyen a la señal obtenida en el ensayo en la primera porción de la muestra.

#### Preparación de anticuerpos

Se describen ejemplos de métodos de preparación de anticuerpos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento a modo de ilustración y no de limitación. Se requieren al menos dos anticuerpos diferentes, que tengan las propiedades de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento. Un anticuerpo presenta suficiente afinidad de unión de ensayo tanto para el primer analito isomérico como para el segundo analito isomérico. El otro anticuerpo se une al primer analito isomérico, pero presenta una afinidad de unión de ensayo insuficiente para el primer analito isomérico y no presenta sustancialmente ninguna afinidad de unión de ensayo para el segundo analito isomérico.

La afinidad de unión de ensayo suficiente es de al menos aproximadamente  $10^7$  litros/mol, o al menos aproximadamente  $10^8$  litros/mol, o al menos aproximadamente  $10^9$  litros/mol, o al menos aproximadamente  $10^{10}$  litros/mol, o al menos aproximadamente  $10^{11}$  litros/mol, o al menos aproximadamente  $10^{12}$  litros/mol, o al menos aproximadamente  $10^{13}$  litros/mol, o al menos aproximadamente  $10^{14}$  litros/mol, por ejemplo, y la cantidad de complejo detectable es suficiente para obtener una señal de ensayo que da como resultado una determinación precisa y sensible del analito. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento, la afinidad de unión de ensayo suficiente es de aproximadamente  $10^7$  a aproximadamente  $10^{14}$  litros/mol o de aproximadamente  $10^7$  a aproximadamente  $10^{11}$  litros/mol, o de aproximadamente  $10^7$  a aproximadamente  $10^{12}$  litros/mol, o de aproximadamente  $10^8$  a aproximadamente  $10^{14}$  litros/mol, o de aproximadamente  $10^8$  a aproximadamente  $10^{11}$  litros/mol, o de aproximadamente  $10^8$  a aproximadamente  $10^{12}$  litros/mol, por ejemplo.

Una afinidad de unión de ensayo insuficiente significa que la afinidad de unión del segundo anticuerpo para un primer analito isomérico es menor que la afinidad de unión del primer anticuerpo para el primer analito isomérico. En algunos ejemplos, dependiendo de la afinidad de unión del primer anticuerpo para el primer analito isomérico, la afinidad de unión del segundo anticuerpo por un primer analito isomérico es menor que la afinidad de unión del primer anticuerpo por el primer analito isomérico por un factor, por ejemplo, de aproximadamente 10 o aproximadamente  $10^2$ , o aproximadamente  $10^3$ , o aproximadamente  $10^4$ , o aproximadamente  $10^5$ . Por ejemplo, si la afinidad de unión del primer anticuerpo para el primer analito isomérico es de aproximadamente  $10^9$  litros/mol, la

afinidad de unión del segundo anticuerpo puede ser inferior a aproximadamente  $10^7$  litros/mol o inferior a aproximadamente  $10^6$  litros/mol. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento, una afinidad de unión de ensayo insuficiente significa que la afinidad de unión de un anticuerpo por un analito es de aproximadamente  $10^6$  a aproximadamente  $10^8$  litros/mol o de aproximadamente  $10^6$  a

5 aproximadamente  $10^7$  litros/mol, por ejemplo, dependiendo de la naturaleza del anticuerpo y la naturaleza del analito.

En algunos ejemplos, sustancialmente ninguna afinidad de unión significa que un anticuerpo tiene una afinidad de unión por un analito isomérico de menos de aproximadamente  $10^4$  litros/mol o menos de aproximadamente  $10^3$  litros/mol, o menos de aproximadamente  $10^2$  litros/mol, o menos de aproximadamente 10 litros/mol, por ejemplo.

10 En el análisis anterior, la afinidad de unión es la afinidad de unión específica, que implica el reconocimiento específico de una de dos moléculas diferentes por la otra en comparación con un reconocimiento sustancialmente menor de otras moléculas. Por otro lado, la unión no específica implica la unión no covalente entre moléculas que es relativamente independiente de las estructuras superficiales específicas. La unión no específica puede ser el resultado de varios factores, incluyendo interacciones hidrofóbicas entre moléculas.

15 El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o fragmento de la misma, inmunoglobulinas que incluyen las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, IgM, etc. Los fragmentos de las mismas pueden incluir Fab, Fv y F(ab')<sub>2</sub>, Fab' y similares. Además, pueden usarse agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos cuando sea apropiado a condición de que se mantenga la afinidad de unión por una molécula particular.

20 Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante técnicas que son bien conocidas en la técnica, tales como la preparación de estirpes celulares híbridas continuas y la recolección de la proteína secretada (técnicas de hibridación de células somáticas). Pueden producirse anticuerpos monoclonales de acuerdo con las técnicas convencionales de Köhler y Milstein, *Nature* 265: 495-497, 1975. Se encuentran revisiones de técnicas de anticuerpos monoclonales en *Lymphocyte Hybridomas*, ed. Melchers, et al. Springer-Verlag (Nueva York 1978),

25 *Nature* 266: 495 (1977), *Science* 208: 692 (1980) y *Methods of Enzymology* 73 (Parte B): 3-46 (1981).

En otro enfoque para la preparación de anticuerpos, la secuencia que codifica los sitios de unión del anticuerpo puede escindirse del ADN del cromosoma e insertarse en un vector de clonación, que puede expresarse en bacterias para producir proteínas recombinantes que tienen los sitios de unión del anticuerpo correspondientes. Este enfoque implica clonar y expresar secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de las mismas que

30 codifican al menos las secuencias de aminoácidos necesarias para la unión específica de anticuerpos naturales.

En un enfoque para la producción de anticuerpos monoclonales, una primera etapa incluye la inmunización de un animal productor de anticuerpos tal como un ratón, una rata, una cabra, una oveja o una vaca con el antígeno, por ejemplo, con un inmunógeno. La inmunización puede realizarse con o sin un adyuvante tal como el adyuvante completo de Freund u otros adyuvantes tales como el monofosforil lípido A y el adyuvante dicorinomicolato de trehalosa sintético. Una siguiente etapa incluye el aislamiento de células de bazo del animal productor de anticuerpos y fusionar las células del bazo productoras de anticuerpos con un compañero de fusión apropiado, normalmente una célula de mieloma, tal como mediante el uso de polietilenglicol u otras técnicas. Normalmente, las células de mieloma utilizadas son aquellas que crecen normalmente en medio de hipoxantina-timidina (HT) pero que no pueden crecer en medio de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), utilizados para la selección de las células fusionadas. Una siguiente etapa incluye la selección de las células fusionadas, normalmente mediante selección en medio HAT. Una siguiente etapa incluye el cribado de los híbridos clonados para la producción de anticuerpos apropiados usando inmunoensayos tales como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) u otros inmunoensayos apropiados para el cribado.

35

La expresión "transportador inmunogénico" significa un grupo o resto que, cuando se conjuga con un hapteno y se inyecta en un mamífero o se emplea de otro modo como un inmunógeno, induce una respuesta inmunitaria y provoca la producción de anticuerpos que se unen al hapteno. Los transportadores inmunogénicos también se denominan a veces transportadores antigénicos. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento, se sintetizan y usan inmunógenos que comprenden transportadores inmunogénicos, incluyendo transportadores inmunogénicos de poli(aminoácidos) y no poli(aminoácidos), unidos a un compuesto inmunosupresor en una posición particular y se usan para la preparación de anticuerpos. Los haptenos son compuestos capaces de unirse específicamente a los anticuerpos correspondientes, pero no actúan ellos mismos como inmunógenos (o antígenos) para la preparación de los anticuerpos. En consecuencia, un hapteno se une a un transportador inmunogénico, que se emplea para generar anticuerpos.

45

El intervalo de pesos moleculares (en Daltons) para los poli(aminoácidos) que son transportadores inmunogénicos es de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 10.000.000, o de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 600.000, o de aproximadamente 25.000 a aproximadamente 250.000 de peso molecular, por ejemplo. Los transportadores inmunogénicos de poli(aminoácidos) incluyen proteínas tales como, por ejemplo, albúminas,

55

5 proteínas séricas, por ejemplo, globulinas, proteínas de cristalino y lipoproteínas. Las proteínas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés), hemocianina de lapa californiana (KLH, por sus siglas en inglés), ovoalbúmina de huevo y gamma-globulina bovina (BGG, por sus siglas en inglés), por ejemplo. Los transportadores inmunogénicos no de poli(aminoácidos) incluyen polisacáridos, ácidos nucleicos y partículas (materiales biológicos y sintéticos). Se desvela una amplia diversidad de transportadores inmunogénicos en Davalian, et al., Patente de los EE.UU. N.º 5.089.390, columna 4, línea 57 a columna 5, línea 5.

10 Como se ha mencionado anteriormente, el transportador inmunogénico puede ser un polisacárido, que es un un polímero de alto peso molecular de monosacáridos que puede prepararse de forma natural o sintética y que, por lo general, implica condensaciones repetidas de monosacáridos. Son ejemplos de polisacáridos almidones, glucógeno, celulosa, gomas de carbohidratos, tales como goma arábiga, agar y similares. El polisacárido también puede contener restos de poli(aminoácido) y/o restos de lípidos.

15 Como se ha mencionado anteriormente, en algunos ejemplos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento, el transportador inmunogénico puede unirse a un análogo de analito en una posición predeterminada en el analito por medio de un grupo de enlace. En algunos ejemplos, el grupo de enlace puede comprender de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 átomos o de 4 a aproximadamente 30 átomos, sin contar el hidrógeno, y puede comprender una cadena de 2 a aproximadamente 30 átomos o de 3 a aproximadamente 20 átomos, seleccionados cada uno independientemente entre el grupo que consiste normalmente en carbono, oxígeno, azufre, nitrógeno y fósforo. Parte o la totalidad del grupo de enlace puede ser una porción de la molécula que está unida al compuesto inmunosupresor, tal como, pero no limitada a, un resto de aminoácido en un poli(aminoácido), por ejemplo. En algunos ejemplos, el grupo de enlace comprende una funcionalidad oxima.

20 El número de heteroátomos en el grupo de enlace puede estar en el intervalo de 0 a aproximadamente 20 o de 1 a aproximadamente 15, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 10. El grupo de enlace puede ser alifático o aromático. Cuando hay heteroátomos presentes, el oxígeno normalmente está presente como oxo u oxi, unido a carbono, azufre, nitrógeno o fósforo, el nitrógeno está normalmente presente como nitro, nitroso o amino, normalmente unido a carbono, oxígeno, azufre o fósforo; el azufre es análogo al oxígeno; mientras que el fósforo está unido a carbono, azufre, oxígeno o nitrógeno, por lo general como fosfonato y mono- o diéster de fosfato. Las funcionalidades comunes en la formación de un enlace covalente entre el grupo de enlace y la molécula que se ha de conjugar son alquilamina, amidina, tioamida, éter, urea, tiourea, guanidina, azo, tioéter y carboxilato, sulfonato y ésteres de fosfato, amidas y tioésteres. Una realización específica de un grupo de enlace que comprende heteroátomos es una funcionalidad oxima como se ha mencionado anteriormente.

25 En su mayor parte, cuando un grupo de enlace tiene una funcionalidad de enlace (funcionalidad para la reacción con un resto) tal como, por ejemplo, un grupo no oxocarbonilo incluyendo análogos de nitrógeno y azufre, un grupo fosfato, un grupo amino, un agente alquilante tal como halo o tosilalquilo, oxi (hidroxilo o el análogo de azufre, mercapto) oxocarbonilo (por ejemplo, aldehído o cetona) u olefina activa tal como una vinilsulfona o un éster  $\alpha$  o  $\beta$ -insaturado, estas funcionalidades se unen a grupos amina, grupos carboxilo, olefinas activas, agentes alquilantes, por ejemplo, bromoacetilo. Cuando se unen una amina y un ácido carboxílico o su derivado de nitrógeno o ácido fosfórico, se forman amidas, amidinas y fosforamidas. Cuando el mercaptano y la olefina activada se unen, se forman tioéteres. Cuando se unen un mercaptano y un agente alquilante, se forman tioéteres. Cuando el aldehído y una amina se unen en condiciones reductoras, se forma una alquilamina. Cuando se unen una cetona o aldehído y una hidroxilamina (incluyendo sus derivados cuando un sustituyente está en lugar del hidrógeno del grupo hidroxilo), se forma una funcionalidad oxima (=N-O-). Cuando se unen un ácido carboxílico o ácido de fosfato y un alcohol, se forman ésteres. Diversos grupos de enlace son bien conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Cautrecasas, *J. Biol. Chem.* (1970) 245: 3059.

35 Cada anticuerpo diferente se selecciona por su afinidad de unión a uno o a los dos analitos isoméricos como se ha descrito anteriormente. En consecuencia, se prepara y se selecciona un primer anticuerpo por medio de un método de cribado apropiado de manera que el primer anticuerpo presente una afinidad de unión de ensayo suficiente para cada uno de entre el primer analito isomérico y el segundo analito isomérico. Se prepara y se selecciona un segundo anticuerpo por medio de un método de cribado apropiado de manera que el segundo anticuerpo se una al primer analito isomérico, pero presente una afinidad de unión de ensayo insuficiente para el primer analito isomérico y además no presente sustancialmente ninguna afinidad de unión de ensayo para el segundo analito isomérico. Un anticuerpo con la afinidad de unión necesaria para un analito como se ha establecido anteriormente puede seleccionarse mediante metodologías de cribado bien conocidas, que incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, ELISA, transferencias puntuales, análisis de Western y Resonancia de Plasmón Superficial, por ejemplo.

#### Descripción general de los ensayos

55 Se puede emplear cualquier ensayo apropiado que utilice un anticuerpo en porciones de la muestra en las determinaciones implicadas de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento. Los ensayos pueden realizarse ya sea sin separación (homogéneos) o con separación (heterogéneos) de cualquiera de los componentes o productos de ensayo. Los ensayos heterogéneos generalmente implican una o más etapas de

separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Los ensayos pueden ser manuales o automáticos.

La muestra que se ha de analizar es una que se sospecha que contiene un analito. Las muestras pueden ser muestras biológicas o muestras no biológicas. Las muestras biológicas pueden ser de un sujeto mamífero o un sujeto no mamífero. Los mamíferos pueden ser, por ejemplo, seres humanos u otras especies animales. Las muestras biológicas incluyen fluidos biológicos tales como sangre completa, suero, plasma, esputo, fluido linfático, semen, moco vaginal, heces, orina, fluido espinal, saliva, heces, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, moco y similares; tejido biológico tal como cabello, piel, secciones o tejidos extirpados de órganos u otras partes del cuerpo; etcétera. En muchos casos, la muestra es sangre completa, plasma o suero. Las muestras no biológicas que incluyen, pero no se limitan a, corrientes residuales, por ejemplo, también pueden analizarse usando compuestos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento.

La muestra puede prepararse en cualquier medio conveniente, que puede ser, por ejemplo, un medio de ensayo, que se analiza más detalladamente a continuación en el presente documento. En algunos casos, puede aplicarse un pretratamiento a la muestra, tal como, por ejemplo, para lisar células sanguíneas. En algunos ejemplos, dicho pretratamiento se realiza en un medio que no interfiere posteriormente con un ensayo.

En muchas realizaciones, los inmunoensayos implican reactivos marcados. Los inmunoensayos que implican reactivos marcados incluyen inmunoensayos de quimioluminiscencia, inmunoensayos enzimáticos, inmunoensayos de polarización de fluorescencia, radioinmunoensayos, ensayo de inhibición, ensayos de luminiscencia inducida y ensayos de canalización de oxígeno fluorescente, por ejemplo.

Un grupo general de inmunoensayos incluye inmunoensayos que usan una concentración limitada de uno de los reactivos de ensayo. Otro grupo de inmunoensayos implica el uso de un exceso de uno o más de los principales reactivos. Otro grupo de inmunoensayos son los ensayos homogéneos son separación en los que los reactivos marcados modulan la señal del marcador tras la unión de uno de los anticuerpos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento a uno o a los dos analitos isoméricos en la muestra.

Como se ha mencionado anteriormente, los ensayos pueden realizarse sin separación (homogéneos) o con separación (heterogéneos) de cualquiera de los componentes o productos de ensayo. Los inmunoensayos homogéneos se ejemplifican mediante el ensayo EMIT® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, IL) desvelado en Rubenstein, et al., Patente de los EE.UU. N.º 3.817.837, columna 3, línea 6 a columna 6, línea 64; el inmunoensayo de luminiscencia inducida ("tecnología LOCI®") desvelado en la Patente de los EE.UU. N.º 5.340.716 (Ullman, et al.); métodos de inmunofluorescencia tales como los desvelados en Ullman, et al., Patente de los EE.UU. N.º 3.996.345, columna 17, línea 59, columna 23, línea 25; inmunoensayos de canalización enzimática ("ECIA", por sus siglas en inglés) tales como los desvelados en Maggio, et al., Patente de los Estados Unidos Núm. 4.233.402, columna 6, línea 25 a columna 9, línea 63; el inmunoensayo de polarización de fluorescencia ("FPIA", por sus siglas en inglés) como se describe, por ejemplo, en, entre otros, la Patente de los EE.UU. N.º 5.354.693; inmunoensayos enzimáticos tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas ("ELISA", por sus siglas en inglés). Son ejemplos de ensayos heterogéneos el radioinmunoensayo, desvelados en Yalow, et al., *J. Clin. Invest.* 39: 1157 (1960).

Otros inmunoensayos enzimáticos son el inmunoensayo mediado por enzimas moduladas ("EMMIA", por sus siglas en inglés) analizado por Ngo y Lenhoff, *FEBS Lett.* (1980) 116: 285-288; el inmunoensayo de fluorescencia de sustrato marcado ("SLFIA", por sus siglas en inglés) desvelado por Oellerich, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* (1984) 22: 895-904; los inmunoensayos de donantes enzimáticos combinados ("CEDIA", por sus siglas en inglés) desvelados por Khanna, et al., *Clin. Chem. Acta* (1989) 185: 231-240; inmunoensayos marcados con partículas homogéneas tales como inmunoensayos de inhibición turbidimétricos potenciados con partículas ("PETINIA", por sus siglas en inglés), e inmunoensayo turbidimétrico potenciado con partículas ("PETIA", por sus siglas en inglés), etc.; por ejemplo.

Otros ensayos incluyen el inmunoensayo de partículas sol ("SPIA", por sus siglas en inglés), el inmunoensayo de colorante disperso ("DIA", por sus siglas en inglés); el metaloinmunoensayo ("MIA", por sus siglas en inglés); los inmunoensayos enzimáticos de membrana ("EMIA", por sus siglas en inglés); luminoinmunoensayos ("LIA", por sus siglas en inglés); etcétera. Otros tipos de ensayos incluyen ensayos de inmunosensor que implican el control de los cambios en las propiedades ópticas, acústicas y eléctricas de un reactivo tras la unión de un analito. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunosensor óptico, ensayos de inmunosensor acústico, ensayos de inmunosensor de semiconductor, ensayos de inmunosensor de transductor electroquímico, ensayos de inmunosensor potenciométrico y ensayos de electrodo amperométrico.

Los ensayos heterogéneos generalmente implican una o más etapas de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Se desvela una diversidad de formatos de ensayo heterogéneos competitivos y no competitivos en Davalian, et al., Patente de los EE.UU. N.º 5.089.390, columna 14, línea 25 a columna 15, línea 9. En un ejemplo de un ensayo heterogéneo competitivo, se pone en contacto un soporte que tiene un anticuerpo para analito unido al mismo con un medio que contiene la muestra que se sospecha que contiene el analito y un analito análogo que

comprende un marcador. El analito en la muestra compete, por la unión al anticuerpo del analito, con el análogo del analito marcado. Después de separar el soporte y el medio, la actividad de marcaje del soporte o medio se determina mediante técnicas convencionales y se relaciona con la cantidad de analito en la muestra. En una variación del ensayo heterogéneo competitivo anterior, el soporte comprende un análogo de analito, que compete con el analito de la muestra por la unión a un reactivo de anticuerpo de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento.

En algunos ejemplos, la muestra a analizar se somete a un pretratamiento para liberar el analito de sustancias de unión endógenas tales como, por ejemplo, proteínas de plasma o suero que se unen al analito. La liberación del analito de las sustancias de unión endógenas puede realizarse, por ejemplo, mediante la adición de un agente de digestión o un agente de liberación o una combinación de un agente de digestión y un agente de liberación utilizados secuencialmente. El agente de digestión es el que descompone las sustancias de unión endógenas para que ya no puedan unirse al analito. Dichos agentes incluyen, pero no se limitan a, proteinasa K y proteinasa K y agentes desnaturizantes de proteínas tales como, por ejemplo, detergentes (dodecilsulfato de sodio, por ejemplo). Los agentes de liberación para liberar el analito de las sustancias de unión endógenas incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, agentes desnaturizantes ácidos tales como, por ejemplo, ácido salicílico, warfarina, ácidos sulfónicos, ácidos tolueno sulfónico, ácido naftaleno sulfónico, ácidos anilina-naftaleno sulfónicos (ANS) (incluyendo, por ejemplo, ácido 1-anilina-naftaleno-8-sulfónico (1,8-ANS) y ácido 8-anilina-naftaleno-1-sulfónico (8-ANS)), ácidos salicílicos y derivados de los anteriores.

Las condiciones tales como, por ejemplo, la duración, la temperatura, el pH y la concentración del agente liberador en el medio para realizar las acciones de digestión o liberación dependen de la naturaleza del analito, la naturaleza de las sustancias de unión endógenas, la naturaleza de la muestra y la naturaleza del agente liberador, por ejemplo. En general, las condiciones son suficientes para conseguir el efecto o función deseados. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, una concentración eficaz de agente de liberación es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 20 mg/ml, o de aproximadamente de 0,01 a aproximadamente 10 mg/ml, o de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5 mg/ml, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg/ml, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/ml, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 mg/ml, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 mg/ml. El pretratamiento de la muestra para liberar el analito de las sustancias de unión endógenas puede realizarse como una etapa separada antes de realizar un ensayo o como una primera etapa en un ensayo. En cualquier caso, pueden necesitarse uno o más reactivos para detener la acción del agente de digestión y/o el agente de liberación.

Las condiciones para realizar un ensayo en una porción de una muestra de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento incluyen realizar el ensayo en un medio acuoso tamponado a un pH moderado, generalmente el que proporciona una sensibilidad de ensayo óptima. El medio acuoso puede ser únicamente agua o puede incluir del 0,1 a aproximadamente el 40 por ciento en volumen de un cosolvente. El pH para el medio estará en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, o en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, o en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9,5, por ejemplo. El pH por lo general será un término medio entre la unión óptima de los miembros de unión de cualquier par de unión específico, el pH óptimo para otros reactivos del ensayo tales como los miembros del sistema de producción de señales, etc. Se pueden usar diversos tampones para conseguir el pH deseado y mantener el pH durante el ensayo. Los tampones ilustrativos incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, borato, fosfato, carbonato, TRIS, barbital, PIPES, HEPES, MES, ACES, MOPS y BICINE, por ejemplo. El tampón particular empleado no es crítico, pero en un ensayo individual puede preferirse uno u otro tampón.

Pueden emplearse diversos materiales auxiliares en los métodos de ensayo. Por ejemplo, además de tampones, el medio puede comprender estabilizadores para el medio y para los reactivos empleados. En algunas realizaciones, además de estos aditivos, pueden incluirse proteínas, tales como, por ejemplo, albúminas; disolventes orgánicos tales como, por ejemplo, formamida; sales de amonio cuaternario; polianiones tales como, por ejemplo, sulfato de dextrano; potenciadores de unión, por ejemplo, polialquilenglicoles; polisacáridos tales como, por ejemplo, dextrano o trehalosa. El medio también puede comprender agentes para prevenir la formación de coágulos sanguíneos. Dichos agentes son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, EDTA, EGTA, citrato, heparina, por ejemplo. El medio también puede comprender uno o más conservantes tales como, entre otros, azida sódica, sulfato de neomicina, PROCLIN® 300, estreptomina, por ejemplo. El medio puede comprender adicionalmente uno o más tensioactivos. Cualquiera de los materiales anteriores, si se emplea, está presente en una concentración o cantidad suficiente para conseguir el efecto o la función deseados.

Pueden aplicarse uno o más períodos de incubación al medio a uno o más intervalos incluyendo cualquier intervalo entre las adiciones de diversos reactivos empleados en un ensayo incluyendo los mencionados anteriormente. El medio por lo general se incuba a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que se produzca la unión de diversos componentes de los reactivos y la unión del analito en la muestra. Normalmente se emplean temperaturas moderadas para realizar el método y, por lo general, temperatura constante, preferentemente, temperatura ambiente, durante el período de medición. En algunos ejemplos, las temperaturas de incubación varían de aproximadamente 5 ° a aproximadamente 99 °C o de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 70 °C, o de

aproximadamente 20 °C a aproximadamente 45 °C, por ejemplo. El período de tiempo para la incubación, en algunos ejemplos, es de aproximadamente 0,2 segundos a aproximadamente 24 horas o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 6 horas, o de aproximadamente 2 segundos a aproximadamente 1 hora, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 15 minutos, por ejemplo. El período de tiempo depende de la temperatura del medio y de la velocidad de unión de los diversos reactivos, que está determinada por la constante de velocidad de asociación, la concentración, la constante de unión y la constante de velocidad de disociación.

Muchos ensayos analizados en el presente documento usan un sistema de producción de señales, que puede tener uno o más componentes, siendo al menos un componente un marcador. El sistema de producción de señales genera una señal que se relaciona con la presencia de un analito en una muestra. El sistema de producción de señales incluye todos los reactivos necesarios para producir una señal medible. Otros componentes del sistema de producción de señales pueden incluirse en una solución reveladora y pueden incluir, pero no se limitan a, sustratos, potenciadores, activadores, compuestos quimioluminiscentes, cofactores, inhibidores, neutralizantes, iones metálicos y sustancias de unión específicas necesarias para la unión de sustancias generadoras de señal, por ejemplo. Otros componentes del sistema de producción de señales pueden ser coenzimas, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, otras enzimas y catalizadores, por ejemplo. El sistema de producción de señales proporciona una señal detectable por medios externos, mediante el uso de radiación electromagnética, deseablemente mediante examen visual. Los sistemas de producción de señales de ejemplo se describen en la Patente de los EE.UU. N.º 5.508.178.

El término "marcador" incluye marcadores de poli(aminoácidos) y marcadores no de poli(aminoácidos). La expresión "restos de marcador de poli(aminoácido)" incluye marcadores que son proteínas tales como, pero no limitadas a, enzimas, anticuerpos, péptidos e inmunógenos, por ejemplo. Con proteínas marcadoras, tales como, por ejemplo, enzimas, el intervalo de peso molecular será de aproximadamente 600.000 aproximadamente o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 300.000 de peso molecular. Por lo general hay al menos un compuesto de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento (grupo análogo) por aproximadamente 200.000 de peso molecular, o al menos aproximadamente 1 por aproximadamente 150.000 de peso molecular, o al menos aproximadamente 1 por aproximadamente 100.000 de peso molecular, o al menos aproximadamente 1 por aproximadamente 50.000 de peso molecular, por ejemplo, de la proteína. En el caso de las enzimas, el número de grupos análogos es por lo general de 1 a aproximadamente 20, de aproximadamente 2 a aproximadamente 15, de aproximadamente 3 a aproximadamente 12 o de aproximadamente 6 a aproximadamente 10.

Las enzimas incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, enzimas redox tales como, por ejemplo, deshidrogenasas, por ejemplo, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa; enzimas que implican la producción de peróxido de hidrógeno y el uso del peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante a un colorante tal como, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, lactoperoxidasa y microperoxidasa; hidrolasas tales como, por ejemplo, fosfatasa alcalina y  $\beta$ -galactosidasa; luciferasas tales como, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; transferasas; combinaciones de enzimas tales como, pero no limitadas a, oxidasas de sacáridos, por ejemplo, glucosa y galactosa oxidasa, u oxidasas de compuestos heterocíclicos, tales como la uricasa y la xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante, es decir, una peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante, lactoperoxidasa o microperoxidasa, por ejemplo.

La expresión "marcadores no de poli(aminoácidos)" incluye aquellos marcadores que no son proteínas. El marcador no de poli(aminoácido) es susceptible de ser detectado directamente o es detectable a través de una reacción que produce una señal detectable. El marcador no de poli(aminoácido) puede ser isotópico o no isotópico y puede ser, a modo de ilustración y no de limitación, un radioisótopo, un compuesto luminiscente (que incluye, pero no se limita a, compuestos fluorescentes y compuestos quimioluminiscentes, por ejemplo), un polinucleótido que codifica un catalizador, un promotor, un colorante, una coenzima, un sustrato de enzima, un grupo radioactivo y una secuencia polinucleotídica amplificable, por ejemplo.

En algunos ejemplos, un miembro del sistema de producción de señales es una molécula orgánica pequeña que se refiere a una molécula de peso molecular de aproximadamente 200 a aproximadamente 2.000 o de aproximadamente 200 a aproximadamente 1.500, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 1.000, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 500. Dichas moléculas orgánicas pequeñas incluyen, pero sin limitación, biotina, moléculas fluorescentes (tales como fluoresceína y rodamina, por ejemplo), moléculas quimioluminiscentes y dinitrofenol, por ejemplo. Un compañero de unión para una molécula orgánica pequeña es una molécula que específicamente reconoce y se une a la molécula pequeña. Los compañeros de unión para una molécula pequeña se definen por la naturaleza de la molécula pequeña e incluyen, pero no se limitan a, avidina, estreptavidina, anticuerpo para la pequeña molécula orgánica (que incluye, pero no se limita a, anticuerpo para una molécula fluorescente tal como anticuerpo para fluoresceína y anticuerpo para rodamina, por ejemplo), anticuerpo para una molécula quimioluminiscente, anticuerpo para dinitrofenol, por ejemplo.

En algunos ejemplos de ensayos, se utiliza un soporte. El soporte puede estar compuesto por un material insoluble en agua, sólido o fluido, orgánico o inorgánico, y que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte puede tener cualquiera de una serie de formas, tales como, pero sin limitación, una partícula (soporte en forma de partículas) incluyendo una perla, una película, una membrana, un tubo, un pocillo, una tira, una varilla, una fibra o una superficie plana tal como, por ejemplo, una placa o papel, por ejemplo. El soporte puede o no suspenderse en el medio en el que se emplea. Son ejemplos de soportes que pueden suspenderse materiales poliméricos, tales como látex, bicapas lipídicas o liposomas, gotitas de aceite, células e hidrogeles y partículas magnéticas, por ejemplo. Otras composiciones de soporte incluyen polímeros, tales como, a modo de ilustración y no de limitación, nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4 metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nylon, poli(butirato de vinilo), por ejemplo, ya sea utilizados solos o en combinación con otros materiales. El soporte puede o no estar marcado adicionalmente con un colorante, catalizador u otro grupo detectable, por ejemplo.

En algunos ejemplos, el soporte puede ser una partícula. Las partículas tienen un diámetro promedio de al menos aproximadamente 0,02 micrómetros y no más de aproximadamente 100 micrómetros. En algunos ejemplos, las partículas tienen un diámetro promedio de aproximadamente 0,05 micrómetros a aproximadamente 20 micrómetros o de aproximadamente 0,3 micrómetros a aproximadamente 10 micrómetros. La partícula puede ser orgánica o inorgánica, hinchable o no hinchable, porosa o no porosa, preferentemente de una densidad cercana a la del agua, generalmente de aproximadamente 0,7 g/ml a aproximadamente 1,5 g/ml y compuesta de material que puede ser transparente, parcialmente transparente u opaco. Las partículas pueden ser materiales biológicos tales como células y microorganismos, por ejemplo, eritrocitos, leucocitos, linfocitos, hibridomas, estreptococos, *Staphylococcus aureus* y *E. coli*, virus, por ejemplo. Las partículas también pueden ser partículas compuestas de polímeros orgánicos e inorgánicos, liposomas, partículas de látex, partículas magnéticas o no magnéticas, vesículas de fosfolípidos, quilomicrones, lipoproteínas y similares. En algunos ejemplos, las partículas son partículas de dióxido de cromo (cromo) o partículas de látex.

Las partículas quimioluminiscentes son partículas que tienen asociado a las mismas un compuesto quimioluminiscente. La frase "asociado a las mismas" como se usa en el presente documento significa que un compuesto tal como, por ejemplo, un compuesto quimioluminiscente y una partícula pueden asociarse mediante enlace directo o indirecto, adsorción, absorción, incorporación o solución, por ejemplo. Son ejemplos de compuestos quimioluminiscentes que pueden utilizarse los expuestos en las Patentes de los EE.UU. N.º 5.340.716 y 6.251.581. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento, el compuesto quimioluminiscente es una sustancia fotoactivable que experimenta una reacción química tras la excitación directa o sensibilizada por la luz, o tras la reacción con oxígeno singlete para formar un producto de reacción metaestable que es capaz de descomponerse con la emisión simultánea o posterior de luz, por lo general dentro del intervalo de longitud de onda de 250 a 1200 nm. El término "fotoactivable" incluye "activable fotoquímicamente". En algunos ejemplos, los compuestos quimioluminiscentes son aquellos que reaccionan con el oxígeno singlete para formar dioxetanos o dioxetanonas. Las últimas son por lo general olefinas ricas en electrones. Son ejemplos de dichas olefinas ricas en electrones enol éteres, enaminas, 9-alkiliden-N-alkilacridanos, arilviniléteres, dioxanos, arilimidazoles, 9-alkiliden-xantanos y lucigenina. Otros compuestos incluyen luminol y otros ftalilhidrazidas y compuestos quimioluminiscentes que están protegidos frente a experimentar una reacción quimioluminiscente en virtud de estar protegidos por un grupo protector fotoquímicamente lábil, incluyendo dichos compuestos, por ejemplo, luciferina de luciérnaga, acuaporina y luminol. Son ejemplos de dichos compuestos quimioluminiscentes que pueden utilizarse los que se exponen en la Patente de los EE.UU. N.º 5.709.994.

Las partículas de sensibilizador son partículas que tienen asociado a las mismas un compuesto sensibilizador, que incluye, pero no se limita a, un compuesto fotosensibilizador. Son ejemplos de compuestos sensibilizadores que pueden utilizarse los que se exponen en las Patentes de los EE.UU. N.º 5.340.716 y 6.251.581.

Un fotosensibilizador es un sensibilizador para la generación de oxígeno singlete por lo general mediante excitación con luz. En algunos ejemplos, el fotosensibilizador absorbe a una longitud de onda más larga que el compuesto quimioluminiscente y tiene un triplete de energía menor que el compuesto quimioluminiscente. El fotosensibilizador puede ser fotoactivable (por ejemplo, colorantes y compuestos aromáticos). El fotosensibilizador es por lo general un compuesto por átomos unidos covalentemente, por lo general con múltiples enlaces dobles o triples conjugados. El compuesto debe absorber luz en el intervalo de longitud de onda de 200-1100 nm, por lo general de 300-1000 nm, preferentemente de 450-950 nm. Los fotosensibilizadores típicos incluyen, pero no se limitan a, acetona, benzofenona, 9-tioxantona, eosina, 9,10-dibromoantraceno, azul de metileno, metalo-porfirinas (por ejemplo, hematoporfirina), ftalocianinas, clorofilas, Rosa de Bengala, fullereno de Buckminster, por ejemplo, y derivados de estos compuestos. Se enumeran ejemplos de otros fotosensibilizadores en N.J. Turro, "*Molecular Photochemistry*", página 132, W.A. Benjamin Inc., N.Y. 1965. El fotosensibilizador ayuda a la fotoactivación donde la activación es mediante oxígeno singlete. Por lo general, el fotosensibilizador absorbe la luz y el fotosensibilizador excitado formado de este modo activa el oxígeno para producir oxígeno singlete, que reacciona con el compuesto quimioluminiscente para proporcionar un intermedio luminiscente metaestable.

Algunos ensayos conocidos utilizan un sistema de producción de señales (sps) que emplea los miembros del sps primero y segundo. Los miembros del sps pueden estar relacionados en que la activación de un miembro del sps produce un producto tal como, por ejemplo, luz o un producto activado, lo que da como resultado la activación de otro miembro del sps.

- 5 En un ejemplo de un ensayo de este tipo, los miembros del sps comprenden un sensibilizador tal como, por ejemplo, un fotosensibilizador y una composición quimioluminiscente que incluye un compuesto quimioluminiscente donde la activación del sensibilizador da como resultado un producto que activa la composición quimioluminiscente. El segundo miembro del sps por lo general genera una señal detectable que se relaciona con la cantidad de miembro del sps unido y/o sin unir, es decir, la cantidad de miembro del sps unido o sin unir al analito que se está detectando.
- 10 En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento memoria, uno de entre el reactivo sensibilizador o el reactivo quimioluminiscente comprende un reactivo de anticuerpos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento.

#### Ejemplos de métodos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento

- 15 Como se ha analizado anteriormente, los métodos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento tienen por objeto determinar en una muestra una cantidad de un primer analito isomérico y un segundo analito isomérico, en los que los analitos isoméricos son 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> y 3-epi 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>. En el método, se determinan un primer valor de medición y un segundo valor de medición. Para la determinación del primer valor de medición, se mide una cantidad total del primer analito isomérico y el segundo analito isomérico mediante la realización de un ensayo en una primera porción de la muestra usando un primer anticuerpo que presenta suficiente afinidad de unión de ensayo para cada uno de entre el primer analito isomérico y el segundo analito isomérico. En este ejemplo, el primer anticuerpo es un anticuerpo monoclonal preparado mediante uno de los procedimientos descritos anteriormente.

- 25 La porción de muestra puede prepararse en cualquier medio conveniente que no interfiera con un ensayo; generalmente se emplea un medio acuoso. El tamaño de la porción de muestra depende de una o más de entre la naturaleza de los analitos isoméricos, la naturaleza del ensayo, la naturaleza de los diversos reactivos para realizar el ensayo y la naturaleza del complejo que comprende el analito, por ejemplo. El tamaño de la porción de muestra debería ser esencialmente el mismo para ambas mediciones implicadas en la determinación. En algunos ejemplos, el volumen de la porción de muestra es de aproximadamente 1 µl a aproximadamente 100 µl, o de aproximadamente 2 µl a aproximadamente 100 µl, o de aproximadamente 5 µl a aproximadamente 100 µl, o de aproximadamente 10 µl a aproximadamente 100 µl, o de aproximadamente 1 µl a aproximadamente 80 µl, o de aproximadamente 1 µl a aproximadamente 60 µl, o de aproximadamente 1 µl a aproximadamente 40 µl, o de aproximadamente 1 µl a aproximadamente 20 µl, o de aproximadamente 5 µl a aproximadamente 50 µl, o de aproximadamente 10 µl a aproximadamente 50 µl, por ejemplo.

- 35 El ensayo seleccionado para la determinación del primer valor de medición se realiza en la primera porción de muestra, que puede pretratarse como se ha analizado anteriormente para liberar el analito de las sustancias de unión endógenas. Una cantidad de un complejo que comprende el primer anticuerpo para el analito y el primer y segundo analitos isoméricos se mide mediante la medición de un nivel de señal generado por el complejo. La señal observada se relaciona con una cantidad total de primer analito isomérico y segundo analito isomérico combinados en la muestra.

- 40 Para la determinación del segundo valor de medición, se mide una cantidad del segundo analito isomérico mediante la realización del ensayo en una segunda porción de la muestra usando el primer anticuerpo y el medio de ensayo comprende adicionalmente un segundo anticuerpo que se une al primer analito isomérico, pero presenta una afinidad de unión de ensayo insuficiente para el primer analito isomérico y sustancialmente ninguna afinidad de unión de ensayo para el segundo analito isomérico. La segunda porción de muestra puede pretratarse como se ha analizado anteriormente para liberar el analito de las sustancias de unión endógenas. Como alternativa, la muestra puede pretratarse antes de tomar porciones que se han de emplear en los métodos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento. En este ejemplo, el segundo anticuerpo es un anticuerpo monoclonal preparado mediante uno de los procedimientos descritos anteriormente. El segundo anticuerpo se emplea en exceso con relación al primer anticuerpo en el medio de ensayo que comprende la segunda porción de la muestra para bloquear la unión del primer analito isomérico al primer anticuerpo. La cantidad en exceso es una cantidad mayor que la del primer anticuerpo necesaria para unir la mayor parte del primer analito isomérico que podría estar presente en una muestra. La cantidad del segundo anticuerpo empleado depende de la naturaleza del segundo anticuerpo, la naturaleza del primer anticuerpo, la naturaleza de los analitos isoméricos, la naturaleza del medio de ensayo y la naturaleza del ensayo, por ejemplo. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, una cantidad en exceso del segundo anticuerpo es de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 veces o de aproximadamente 5 a aproximadamente 150 veces, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 veces, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 veces, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 veces, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 150 veces, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 veces, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 veces, o de aproximadamente 20 a

aproximadamente 200 veces, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 150 veces, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 veces, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 veces la del primer anticuerpo, por ejemplo. Una cantidad de un complejo que comprende el primer anticuerpo para el analito y el segundo analito isomérico se mide mediante la medición de un nivel de señal generado por el complejo. La señal observada se relaciona con una cantidad del segundo analito isomérico en la muestra. El segundo valor de medición se resta del primer valor de medición para obtener un valor resultante y el valor resultante se iguala a una cantidad del primer analito isomérico en la muestra.

Como se ha analizado más en detalle anteriormente, puede emplearse cualquier ensayo adecuado. El ensayo comprende añadir reactivos para la determinación de la concentración de un analito en la muestra. Los reactivos incluyen al menos el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo y, por tanto, el ensayo es un inmunoensayo. Los ensayos realizados en las porciones de muestra pueden realizarse secuencialmente o de forma concomitante en recipientes de reacción separados o secuencialmente en el mismo recipiente de reacción para cada porción de muestra. El término "complejo" se refiere a un complejo en el que el anticuerpo para el analito está unido al analito en la muestra.

Como se ha mencionado anteriormente, las mediciones de los analitos isoméricos pueden realizarse en muestras que se han tratado con un agente de liberación. La cantidad de agente de liberación que se añade a la muestra es la que es suficiente para desplazar sustancialmente todos los analitos isoméricos de las sustancias de unión endógenas. La frase "desplazar sustancialmente todos los analitos isoméricos que están unidos por sustancias de unión endógenas" significa que los analitos isoméricos están al menos un 80 % o al menos un 90 %, o al menos un 95 %, o al menos un 99 %, o al menos un 99,5 %, o al menos un 99,9 % o está un 100 % desplazados de las sustancias de unión endógenas y disponibles para la detección durante un ensayo.

Después de la adición de un agente de liberación, la muestra se incuba durante un período de tiempo en condiciones para desplazar sustancialmente la totalidad de los analitos isoméricos de las sustancias de unión endógenas. La duración y las condiciones de la incubación dependen de una o más de las características del agente liberador, la naturaleza del analito y la concentración supuesta del analito, por ejemplo. En algunas realizaciones, las temperaturas de incubación para esta etapa pueden ser de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 99 °C, o de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 70 °C, o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 45 °C, por ejemplo. El período de tiempo para la incubación es de aproximadamente 0,2 segundos a aproximadamente 24 horas, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 6 horas, o de aproximadamente 2 segundos a aproximadamente 1 hora, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 minutos, por ejemplo. La incubación puede realizarse en un medio que, por comodidad, puede ser un medio de ensayo como se describe en el presente documento, pero no es necesario.

Un ejemplo particular de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento se refiere a un método que emplea los siguientes reactivos de ensayo en las porciones primera y segunda de la muestra que se sospecha que contiene el analito: (i) un reactivo de anticuerpo de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento, (ii) un reactivo de partículas quimioluminiscentes que comprende un análogo de analito y (iii) un reactivo de partículas fotosensibilizadoras que comprende un resto de unión a molécula pequeña o un compañero de unión para la molécula pequeña.

Se puede emplear un inmunoensayo de luminiscencia inducida. El inmunoensayo de luminiscencia inducida se menciona en la Patente de los EE.UU. N.º 5.340.716 (Ullman). En un enfoque, el ensayo utiliza una partícula que tiene asociado un fotosensibilizador en el que un análogo de vitamina D se une a la partícula (reactivo análogo de partículas). Para el ensayo de la primera porción de una muestra que se sospecha que contiene las formas no epi y epi del analito de vitamina D, el reactivo quimioluminiscente comprende un primer anticuerpo que presenta suficiente afinidad de unión de ensayo para cada una de las formas no epi y epi del analito de vitamina D. Para el ensayo en la segunda porción de una muestra, el reactivo quimioluminiscente que comprende el primer anticuerpo se emplea junto con un segundo anticuerpo que se une a la forma no epi del analito de vitamina D pero presenta una afinidad de unión de ensayo insuficiente para la forma no epi del analito de vitamina D y sustancialmente sin afinidad de unión de ensayo para la forma epi del analito de vitamina D. En el ejemplo anterior, el primer anticuerpo se une a una molécula pequeña, que se une a un compañero de unión para la molécula pequeña en una partícula quimioluminiscente. Este reactivo quimioluminiscente puede preformarse o formarse in situ. El analito de vitamina D (formas no epi y epi) compite con el reactivo análogo de partículas por la unión al anticuerpo de vitamina D de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento. Si el analito de vitamina D está presente, menor es el número de moléculas de reactivo de análogo de partículas que se acercan mucho al reactivo quimioluminiscente. Por tanto, habrá una disminución en la señal del ensayo. El fotosensibilizador genera oxígeno singlete y activa el reactivo quimioluminiscente cuando los dos marcadores están muy cerca. El reactivo quimioluminiscente activado produce posteriormente luz, donde se observa una disminución de la señal en presencia del analito. La cantidad de luz producida está relacionada con la cantidad del complejo formado, que a su vez, para el ensayo en la primera porción de muestra se relaciona con la cantidad de formas no epi y epi del analito de vitamina D presente en la muestra (primer valor de medición) y para el ensayo en la segunda porción de muestras se relaciona con la cantidad de la forma epi del analito de vitamina D presente en la muestra (segundo

valor de medición). La resta del segundo valor de medición del primer valor de medición proporciona la cantidad de la forma no epi del analito de vitamina D en la muestra.

5 En otro ejemplo particular de un inmunoensayo de luminiscencia inducido que usa vitamina D como ejemplo, a modo de ilustración y no de limitación, el ensayo usa una partícula que tiene asociado un compuesto quimioluminiscente donde un análogo de vitamina D se une a la partícula (reactivo análogo de partículas). Para la primera porción de muestra, un reactivo fotosensibilizador comprende un primer anticuerpo que presenta suficiente afinidad de unión de ensayo para cada una de las formas no epi y epi del analito de vitamina D, que está unido a una molécula pequeña que a su vez está unida a un compañero de unión de la molécula pequeña en una partícula quimioluminiscente. Para la segunda porción de muestra, se emplean el reactivo fotosensibilizador y un segundo anticuerpo. El segundo anticuerpo se une a la forma no epi del analito de vitamina D, pero presenta una afinidad de unión de ensayo insuficiente para la forma no epi del analito de vitamina D y sustancialmente ninguna afinidad de unión de ensayo para la forma epi del analito de vitamina D. Para la primera porción de muestra, tanto la forma no epi como la forma epi del analito de vitamina D compiten con el reactivo análogo de partículas por la unión al primer anticuerpo para vitamina D. Si el analito de vitamina D está presente, menor es el número de moléculas de reactivo análogo de partículas que están muy cerca del reactivo fotosensibilizador. Por tanto, habrá una disminución en la señal del ensayo. Para la segunda porción de muestra, la forma epi del analito de vitamina D compete con el reactivo análogo de partículas por la unión al primer anticuerpo de vitamina D debido a que la forma no epi del analito de vitamina D está unida por el segundo anticuerpo. Si la forma epi del analito de vitamina D está presente, menor es el número de moléculas de reactivo análogo de partículas que se acercan mucho al reactivo fotosensibilizador. Por tanto, habrá una disminución en la señal del ensayo. El fotosensibilizador genera oxígeno singlete y activa el compuesto quimioluminiscente del reactivo análogo de partículas cuando los dos marcadores están muy cerca. El compuesto quimioluminiscente activado produce posteriormente luz, donde se observa una disminución de la señal en presencia del analito. La cantidad de luz producida está relacionada con la cantidad del complejo formado, que a su vez para el ensayo en la primera porción de muestra se relaciona con la cantidad de formas no epi y epi del analito de vitamina D presente en la muestra (primer valor de medición) y para el ensayo en la segunda porción de muestra se relaciona con la cantidad de la forma epi del analito de vitamina D presente en la muestra (segundo valor de medición). La resta del segundo valor de medición del primer valor de medición proporciona la cantidad de la forma no epi del analito de vitamina D en la muestra.

30 En otro ejemplo particular de un ensayo de luminiscencia inducida que usa vitamina D a modo de ilustración y no de limitación, se emplea una partícula fotosensibilizadora que está conjugada con un compañero de unión para una molécula pequeña tal como, por ejemplo, avidina o estreptavidina (que son compañeros de unión para la biotina). Se emplea un reactivo de anticuerpo de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento que comprende biotina unida a un primer anticuerpo que se une tanto a las formas no epiméricas como a las formas epiméricas del analito de vitamina D. Se emplea un reactivo quimioluminiscente como parte del sistema de detección. El medio de reacción para la primera porción de muestra o la segunda porción de muestra, según sea el caso, se incuba para permitir que la avidina o estreptavidina de las partículas fotosensibilizadoras se unan a la biotina del reactivo de anticuerpo en virtud de la unión entre avidina y biotina, y también para permitir la unión específica entre el primer anticuerpo del reactivo de anticuerpo de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento, que ahora está unido a las partículas fotosensibilizadoras, para unirse al analito de la muestra y al analito que es parte del reactivo quimioluminiscente. Después, el medio se irradia con luz para excitar el fotosensibilizador, que es capaz en su estado excitado de activar el oxígeno a un estado singlete. Debido a que una menor cantidad del reactivo quimioluminiscente está ahora muy cerca del fotosensibilizador debido a la presencia del analito, hay menos activación del reactivo quimioluminiscente por el oxígeno singlete y menos luminiscencia. Después, el medio se examina para la determinación de la presencia y/o la cantidad de luminiscencia o luz emitida, estando su presencia relacionada con la presencia y/o cantidad del analito donde se observa una disminución en la señal en presencia del analito. La cantidad de luz producida está relacionada con la cantidad del complejo formado, que a su vez para el ensayo en la primera porción de muestra se relaciona con la cantidad de formas no epi y epi del analito de vitamina D presente en la muestra (primer valor de medición) y para el ensayo en la segunda porción de muestras se relaciona con la cantidad de la forma epi del analito de vitamina D presente en la muestra (segundo valor de medición). La resta del segundo valor de medición del primer valor de medición proporciona la cantidad de la forma no epi del analito de vitamina D en la muestra.

Otro ejemplo de un formato de ensayo para la detección de vitamina D, a modo de ilustración y no de limitación, en una muestra es el formato del ensayo ACMIA. Para el formato de ensayo ACMIA, se emplean partículas de cromo, que están recubiertas con vitamina D o un análogo de vitamina D (reactivo de partículas de cromo), como primer componente. Un segundo componente es un reactivo de anticuerpo que comprende un anticuerpo para la vitamina D de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento. En el reactivo de anticuerpo, el anticuerpo se une por medio de un grupo de unión a una enzima indicadora (por ejemplo,  $\beta$ -galactosidasa) para formar un conjugado de anticuerpo-enzima. El reactivo de anticuerpo se añade a un recipiente de reacción en una cantidad en exceso, es decir, una cantidad mayor que la necesaria para unir todo el analito de vitamina D que podría estar presente en una muestra. Una primera porción de una muestra, que se somete previamente a tratamiento con un agente de liberación, se trata con un primer reactivo de anticuerpo como se ha descrito anteriormente, que comprende un anticuerpo que presenta suficiente afinidad de unión de ensayo para cada una de las formas no epi y

epi del analito de vitamina D; el anticuerpo se une a la vitamina D en la muestra. El conjugado anticuerpo-enzima se mezcla con muestra en el medio para permitir que el analito de vitamina D se una al anticuerpo. A continuación, se añade el reactivo de partículas de cromo para unir cualquier exceso de conjugado anticuerpo-enzima. Después, se aplica un imán, que extrae todas las partículas de cromo y el exceso de enzima-anticuerpo de la suspensión y el sobrenadante se transfiere a un recipiente de reacción final. El sustrato de la enzima indicadora se añade al recipiente de reacción final y la actividad de la enzima se mide espectrofotométricamente como un cambio en la absorbancia a lo largo del tiempo. La cantidad de esta señal está relacionada con la cantidad de las formas tanto no epi como epi de la vitamina D en la muestra. Una segunda porción de una muestra, que se somete previamente a tratamiento con un agente de liberación, se trata con el primer reactivo de anticuerpo y un segundo anticuerpo como se ha descrito anteriormente, que comprende un segundo anticuerpo, que se une a la forma no epi del analito de vitamina D pero presenta afinidad de unión de ensayo insuficiente para la forma no epi del analito de vitamina D y sustancialmente ninguna afinidad de unión de ensayo para la forma epi de la vitamina D. El conjugado anticuerpo-enzima se mezcla con muestra en el medio para permitir que el analito de vitamina D se una al anticuerpo. A continuación, se añade el reactivo de partículas de cromo para unir cualquier exceso de conjugado anticuerpo-enzima. Después, se aplica un imán, que extrae todas las partículas de cromo y el exceso de enzima-anticuerpo de la suspensión, y el sobrenadante se transfiere a un recipiente de reacción final. El sustrato de la enzima indicadora se añade al recipiente de reacción final y la actividad de la enzima se mide espectrofotométricamente como un cambio en la absorbancia a lo largo del tiempo. La cantidad de esta señal está relacionada con la cantidad de formas no epi y epi de la vitamina D en la muestra.

Otro ejemplo de un ensayo para formas isoméricas de vitamina D (a modo de ilustración y no de limitación) en una muestra es un inmunoensayo de marcador de éster de acridinio usando partículas paramagnéticas como fase sólida (inmunoensayo ADVIA). El sistema de detección empleado para este ejemplo de un ensayo de vitamina D incluye una molécula pequeña de vitamina D (fracción de captura) como el conjugado de molécula pequeña o conjugado de captura, compañero de unión para las partículas de látex paramagnéticas recubiertas de molécula pequeña como fase sólida (FS) y un anticuerpo marcado con éster de acridinio para la vitamina D (anticuerpo de detección) de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento. La molécula pequeña puede ser, por ejemplo, biotina o fluoresceína y el compañero de unión respectivo puede ser estreptavidina o anticuerpo para fluoresceína. La vitamina D puede unirse a la molécula pequeña directamente o a través de un grupo de unión tal como, por ejemplo, una proteína, por ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA). La vitamina D en una muestra de un paciente compite con la vitamina D del resto de captura por la unión al anticuerpo anti-vitamina D de detección marcado con éster de acridinio. La muestra que se sospecha que contiene vitamina D se somete a un pretratamiento con 1,8-ANS. El ensayo puede realizarse en las porciones de muestra primera y segunda usando anticuerpos respectivos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento y un aparato Centaur®, Centaur® XP o Centaur® CP (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark DE) de acuerdo con las directrices del fabricante proporcionadas con el mismo.

Otro ejemplo de un ensayo para un analito de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento es un inmunoensayo de marcador de éster de acridinio usando partículas paramagnéticas como fase sólida (inmunoensayo ADVIA). El sistema de detección empleado para este ejemplo de un ensayo para analitos isoméricos incluye reactivos de anticuerpos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, en el que una molécula pequeña está unida al anticuerpo por el analito (anticuerpo de captura) como el conjugado de captura, partículas de látex paramagnéticas como fase sólida (FS) recubierta con un compañero de unión para la molécula pequeña del reactivo de anticuerpo y un análogo de analito marcado con éster de acridinio (hapteno de detección). El marcador de éster de acridinio puede unirse directamente al analito para formar el hapteno de detección o puede emplearse un grupo de enlace incluyendo, por ejemplo, una proteína tal como, por ejemplo, BSA. El analito de una muestra compite con el hapteno de detección marcado con éster de acridinio para unirse con el anticuerpo anti-analito. La muestra que se sospecha que contiene el analito puede someterse a un pretratamiento con uno o más de un agente de liberación y un agente de digestión. El ensayo puede realizarse en las porciones primera y segunda de muestra usando un aparato Centaur®, Centaur® XP o Centaur® CP (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark DE) de acuerdo con las instrucciones del fabricante suministradas con el mismo. En variaciones de los ensayos de éster de acridinio anteriores, la molécula pequeña puede ser, por ejemplo, biotina o fluoresceína y los compañeros de unión para la molécula pequeña pueden ser, por ejemplo, avidina o estreptavidina o anticuerpo para fluoresceína, respectivamente.

La concentración de los analitos isoméricos en una muestra que puede someterse a ensayo en general varía de aproximadamente  $10^{-5}$  a aproximadamente  $10^{-17}$  M, o de aproximadamente  $10^{-6}$  a aproximadamente  $10^{-14}$  M, por ejemplo. Consideraciones tales como si el ensayo es cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo (relativo a la cantidad del analito presente en la muestra), la técnica de detección particular y la concentración esperada del analito normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

Las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo generalmente se determinarán por el intervalo de concentración de interés del analito, la naturaleza del ensayo y similares. Sin embargo, la concentración final de cada uno de los reactivos normalmente se determina empíricamente para optimizar la sensibilidad del ensayo en el intervalo de interés. Es decir, una variación en la concentración de analito que sea significativa debería proporcionar

una diferencia de señal medible con precisión. Consideraciones tales como la naturaleza del sistema de producción de señales y la naturaleza de los analitos normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

5 Como se ha mencionado anteriormente, la muestra y los reactivos se proporcionan combinados en el medio. Aunque el orden de la adición al medio puede variar, habrá ciertas preferencias para algunas realizaciones de los formatos de ensayo que se describen en el presente documento. El orden de adición más simple, por supuesto, es añadir todos los materiales simultáneamente y determinar el efecto que el medio de ensayo tiene sobre la señal como en un ensayo homogéneo. Como alternativa, cada uno de los reactivos o grupos de reactivos, puede combinarse secuencialmente. En algunas realizaciones, puede incluirse una etapa de incubación después de cada adición como se ha analizado anteriormente. En ensayos heterogéneos, también pueden emplearse etapas de lavado después de una o más etapas de incubación.

10 Algunos ejemplos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento se refieren a métodos de determinación de una o ambas de entre la presencia y la cantidad de una o ambas formas isoméricas de vitamina D en una muestra que se sospecha que contiene vitamina D y puede denominarse en el presente documento como "ensayos de vitamina D". Como se usa en el presente documento con referencia a los ensayos, la expresión "vitamina D" se refiere a una o más de las formas no epi y epi de uno o más de 25-hidroxicolecalciferol (también denominado calcidiol, calcifediol, 25-hidroxicolecalciferol o 25-hidroxivitamina D (abreviado 25(OH)D); calcidiol; 1,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> (calcitriol; 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>); 1,25-dihidroxivitamina D<sub>4</sub>; 1,25-dihidroxivitamina D<sub>5</sub> y 1,25-dihidroxivitamina D<sub>6</sub>, incluyendo los metabolitos de todos los anteriores.

#### Etapa de exploración

20 En una etapa de un método de ensayo, el medio se examina para determinar la presencia de un complejo que comprende una o más formas isoméricas del analito y el anticuerpo para un analito de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento. La presencia y/o cantidad de uno o los dos complejos indica la presencia y/o cantidad de una o más de las formas isoméricas del analito en la muestra.

25 La frase "medición de la cantidad de analito" se refiere a la determinación cuantitativa, semicuantitativa y cualitativa de uno o más de las formas isoméricas de un analito. Los métodos que son cuantitativos, semicuantitativos y cualitativos, así como todos los demás métodos para la determinación del analito, se consideran métodos de medición de la cantidad del analito. Por ejemplo, un método, que simplemente detecta la presencia o ausencia del analito en una muestra que se sospecha que contiene el analito, se considera incluido dentro del alcance de la presente invención. Los términos "detectar" y "determinar", así como otros sinónimos comunes para la medición, se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

30 En muchas realizaciones, el examen del medio implica la detección de una señal del medio. La presencia y/o cantidad de la señal se relaciona con la presencia y/o la cantidad de una o más de las formas isoméricas de un analito en la muestra. El modo particular de detección depende de la naturaleza del sistema de producción de señales. Como se ha analizado anteriormente, existen numerosos métodos mediante los cuales un marcador de un sistema productor de señales puede producir una señal detectable por medios externos. La activación de un sistema de producción de señales depende de la naturaleza de los miembros del sistema de producción de señales.

35 Las temperaturas durante las mediciones varían en general entre aproximadamente 10 °C y aproximadamente 70 °C o entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 45 °C, o entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 25 °C, por ejemplo. En un enfoque, las curvas patrón se forman usando concentraciones conocidas de analito de vitamina D. También pueden usarse calibradores y otros controles.

40 La luminiscencia o luz producida a partir de cualquier marcador puede medirse visualmente, fotográficamente, actinométricamente, espectrofotométricamente, tal como mediante el uso de un fotomultiplicador o un fotodiodo, o mediante cualquier otro medio conveniente para la determinación de la cantidad de la misma, que se relaciona con la cantidad de analito en el medio. El examen de la presencia y/o cantidad de la señal también incluye la detección de la señal, que generalmente es simplemente una etapa en el que se lee la señal. La señal se lee normalmente usando un instrumento, cuya naturaleza depende de la naturaleza de la señal. El instrumento puede ser, pero no se limita a, un espectrofotómetro, un fluorómetro, un espectrómetro de absorción, un luminómetro y un quimioluminómetro, por ejemplo.

#### Kits que comprenden reactivos para realizar ensayos

50 Pueden prepararse kits para realizar ensayos en porciones de una muestra que se sospecha que contiene formas isoméricas de un analito. Los kits comprenden reactivos de anticuerpos para ensayos que se han de realizar en porciones respectivas de la muestra. En consecuencia, un reactivo de anticuerpo comprende un anticuerpo que presenta una afinidad de unión de ensayo suficiente para cada uno de entre un primer analito isomérico y un segundo analito isomérico. Se incluye un segundo anticuerpo que se une al primer analito isomérico, pero presenta

una afinidad de unión de ensayo insuficiente para el primer analito isomérico y sustancialmente ninguna afinidad de unión de ensayo para el segundo analito isomérico. El kit puede incluir adicionalmente otros reactivos para realizar el ensayo, cuya naturaleza depende del formato de ensayo particular.

5 Los reactivos pueden estar cada uno en recipientes separados o pueden combinarse diversos reactivos en uno o más recipientes dependiendo de la reactividad cruzada y la estabilidad de los reactivos. El kit puede incluir adicionalmente otros reactivos empaquetados por separado para realizar un ensayo tal como miembros de pares de unión específicos adicionales, miembros del sistema de producción de señales y reactivos auxiliares, por ejemplo.

10 Las cantidades relativas de los diversos reactivos en los kits pueden variarse ampliamente para proporcionar concentraciones de los reactivos que optimicen sustancialmente las reacciones que es necesario que se produzcan durante los presentes métodos y adicionalmente para optimizar sustancialmente la sensibilidad de un ensayo. En circunstancias apropiadas, uno o más de los reactivos en el kit pueden proporcionarse en forma de un polvo seco, por lo general liofilizado, incluyendo excipientes, que al disolverse proporcionarán una solución de reactivo que tenga las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo usando un reactivo compuesto de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento. El kit puede incluir adicionalmente una descripción  
15 escrita de un método que utiliza reactivos que incluyen un reactivo compuesto de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento.

La designación "primero" y "segundo" como se usa en el presente documento es completamente arbitraria y no tiene por objeto sugerir ningún orden o clasificación entre los restos referidos ni ningún orden de adición de restos en los presentes métodos.

20 La frase "al menos" como se usa en el presente documento significa que el número de elementos especificados puede ser igual o mayor que el número indicado. La frase "aproximadamente", como se usa en el presente documento, significa que el número enumerado puede diferir en más o menos el 10 %; por ejemplo, "aproximadamente 5" significa un intervalo de 4,5 a 5,5.

### Ejemplos

25 A menos que se indique lo contrario, los materiales en los experimentos a continuación pueden adquirirse en Sigma-Aldrich Chemical Corporation (San Luis, MO) o Fluka Chemical Corporation (Milwaukee, WI). Las partes y los porcentajes desvelados en el presente documento son en peso a volumen a menos que se indique lo contrario.

### Definiciones:

30 mg = miligramo  
g = gramo o gramos  
ng = nanogramo o nanogramos  
ml = mililitro o mililitros  
μl = microlitro o microlitros  
35 μmol = micromolar  
°C = grados centígrados  
min = minuto o minutos  
s = segundo o segundos  
h = hora u horas  
40 p/v = peso en volumen  
v/v = volumen en volumen  
CCF = cromatografía en capa fina  
HPLC = cromatografía líquida de alta resolución  
EDTA = etilendiaminotetraacetato  
PEG = polietilenglicol  
45 EtOAc = acetato de etilo  
DMF = dimetilformamida  
DMSO = dimetilsulfóxido  
MeOP = 1-metoxi-2-propanol  
MES = ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico  
50 DI = destilada  
UPA = Ultra analizador de partículas  
LOCI = inmunoensayo de canalización de oxígeno luminiscente  
Ab = anticuerpo

Preparación de un primer anticuerpo biotinilado que presenta afinidad de unión de ensayo suficiente para la vitamina D no epi y la vitamina D epi

Una solución (0,8 ml a 2,63 mg/ml) de anticuerpo 5H10 de vitamina D (monoclonal de oveja de Bioventix, Farnham, Surrey, Reino Unido) en PO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 300 mM, pH 7,0 se mezcló con 43,2 µl de una solución acuosa (2,0 mg/ml) de NHS-dPEG@4-biotina (Quanta Biodesign Ltd., Powell OH, número de pieza 10200). La cantidad de reactivo de biotinilación añadido representa una exposición molar de 10 veces del agente de biotinilación con el anticuerpo. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 3 horas y después la reacción se inactivó mediante la adición de 80 µl de TRIS 0,5 M. La mezcla de reacción se sometió a intercambio de tampón con PO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 300 mM, pH 7,0 en un dispositivo AMICON® (YM10) hasta que la absorción a 260 nm del efluente fue de ≤ 0,03. La solución de anticuerpo (1,04 ml a 2,1 mg/ml de proteína) se mezcló con 10 µl de PROCLIN® 300 y 10 µl de una solución acuosa de sulfato de neomicina (10 mg/ml), se filtró usando un filtro de jeringa ACRODISC® de 0,2 µm (Pall Corporation) y se almacenó a 2-8 °C.

Preparación de perlas de EPRM-EDA

Se añaden perlas de EPRM (2000 mg, 20,0 ml) a un vial de 40 ml. Las perlas de EPRM se preparan mediante un procedimiento similar al descrito en la Patente de los EE.UU. N.º 7.179.660 y el compuesto quimioluminiscente es 2-(4-(N,N,di-tetradecil)-anilino-3-fenil tioxeno con quelato de europio. Se combina EDA (800 mg, 890 µl) con 10 ml de tampón MES pH 6 (el "Tampón") y aproximadamente 4,2 ml de HCl 6 N. El pH de la mezcla es o se ajusta a, aproximadamente 6,9. La solución de EDA se añade a las perlas de EPRM con formación de vórtice y la mezcla se balancea a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se combina cianoborohidruro de sodio (400 mg) en un vial de 15 ml con 10 ml de agua DI y la combinación se añade a la mezcla de perlas desde arriba. La mezcla se agita a 37 °C durante 18-20 horas. Las perlas se transfieren a seis tubos de centrifuga de 40 ml. Se añade tampón MES para llevar el volumen a 35 ml y la mezcla se centrifuga a 19.000 rpm durante 30 min. El sobrenadante se decanta y las perlas se resuspenden en 2 ml de tampón con una varilla de agitación y se añade tampón adicional a 35 ml. La mezcla somete a ultrasonidos con 18 vatios de potencia durante 30 segundos, usando hielo para mantener la mezcla fría. La etapa de lavado/ultrasonidos se realiza 4 veces para retirar todo el producto químico de activación. Después de la última centrifugación del tampón MES, se añaden 2 ml de tampón que contiene MeOP al 5 % y Tween® 20 al 0,1 % (el "segundo tampón") a los tubos para la etapa de resuspensión. Se añade un segundo tampón adicional a 35 ml antes del tratamiento con ultrasonidos. La suspensión de perlas se centrifuga a 19.000 rpm durante 30 min. El sobrenadante se descarta. El tratamiento con ultrasonidos final usó 12 ml del segundo tampón en cada tubo para proporcionar una dilución 25 mg/ml. El tamaño de partícula es 277 nm como se determina en un instrumento UPA.

La chemibead (perla química) de EPRM se prepara de una manera similar al método descrito en la Patente de los EE.UU. N.º 6.153.442 y la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 20050118727A, cuyas divulgaciones relevantes se incorporan en el presente documento por referencia. La chemibead de EPRM comprende una capa interna de aminodextrano y una capa externa de aldehído de dextrano que tiene funcionalidades aldehído libres. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 5.929.049, 7.179.660 y 7.172.906, cuyas divulgaciones relevantes se incorporan en el presente documento por referencia. La reacción se realiza a una temperatura de aproximadamente 0 a aproximadamente 40 °C durante un período de aproximadamente 16 a aproximadamente 64 horas a un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,0 o de aproximadamente 6, en un medio acuoso tamponado que emplea un tampón adecuado tal como como, por ejemplo, MES. La reacción se interrumpe mediante la adición de un agente de enfriamiento adecuado tal como, por ejemplo, hemiclrorhidrato de carboximetilaminoamina (CMO) y el posterior lavado de las partículas.

Los grupos aldehído en la capa externa de aldehído de dextrano se hacen reaccionar con etilendiamina en condiciones de aminación reductora para formar el reactivo EPRM-EDA que tiene restos colgantes que comprenden una cadena de etileno y un grupo amino terminal. Las condiciones de aminación reductora incluyen el uso de un agente reductor tal como, por ejemplo, un hidruro metálico. La reacción se realiza en un medio acuoso a una temperatura durante la reacción de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 100 °C durante un período de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 48 horas.

Síntesis de 3-carbamato de 25-OH Vitamina D<sub>3</sub> (3-carbamato de 25-OH Vitamina D<sub>2</sub>)

Una mezcla de 22 mg (55 µmol) de 25-OH VD<sub>3</sub> adquirida de ChemReagents.com, Sugarland TX, 100 mg (420 µmol) de carbonato de disuccinimidilo (DSC), 100 µl de trietilamina en 1 ml de acetonitrilo anhidro en un matraz de 5 ml (cubierto con papel de aluminio) se agitó a temperatura ambiente durante 18 h en atmósfera de nitrógeno para preparar 25-OH VD<sub>3</sub> activada. La CCF (EtOAc:Hexano = 2:1) mostró que no quedaba material de partida. Se preparó una suspensión mediante la adición de 150 mg de hemiclrorhidrato de carboximetoxilamina (CMO), 0,3 ml de trietilamina y 1 ml de DMF a un matraz de 10 ml. Se añadió una solución que contenía 25-OH VD<sub>3</sub> activada gota a gota a la suspensión de OCM con agitación, que continuó durante otras 18 h. Se aplicó vacío para retirar los solventes tanto como sea posible (la temperatura del baño de calentamiento no debe superar los 50 °C). Se añadió EtOAc (25 ml) al resto, que se lavó tres veces con 2 ml de salmuera. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y

se filtró; el disolvente se retiró usando rotavapor. Se obtuvo producto en bruto (42 mg) después del secado y se purificó mediante HPLC. Se obtuvo producto puro (24 mg) después de que se secara a alto vacío. El producto se disolvió en 1,2 ml de DMSO anhidro. Se transfirieron alícuotas a viales, que se mantuvieron a -70 °C.

#### Acoplamiento de EPRM-EDA y 3-carbamato de 25-OH vitamina D<sub>3</sub> para proporcionar el reactivo chemibead

5 Se añadió 3-carbamato de 25-OH vitamina D<sub>3</sub> (10 µl de alícuota en DMSO preparada como se ha descrito anteriormente) (0,2 mg) a un vial de 2 ml. Se añadieron EDAC (6,8 mg) y SNHS (9,4 mg) más 2,27 ml de DMSO seco (3 mg/ml) a un vial de 5 ml. La solución de EDAC/SNS (190 µl) se combinó con el contenido del vial de 2 ml anterior (1 mg/ml) para preparar 3-carbamato de 25-OH vitamina D<sub>3</sub> activo. La mezcla se dejó rotar a temperatura ambiente durante 18 horas. Una alícuota de 0,4 ml de una solución de tensioactivo GAFAC® al 16 % (GAF Corporation, Wayne NJ) (0,15 %) se diluyó al 1,6 % con 3,6 ml de agua DI.

Se combinaron vitamina D<sub>3</sub> (8,5 mg) y 850 µl de DMSO (10 mg/ml). A un matraz de fondo redondo de 10 ml (etiquetado como 3323-064B) equipado con una varilla de agitación se le añadieron 2,0 ml (200 mg) de EPRM-EDA seguido de 400 µl (4 mg) de la solución de vitamina D<sub>3</sub> desde arriba. La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente.

15 A un matraz de fondo redondo de 10 ml equipado con una barra de agitación se le añadieron 2,0 ml (200 mg) de EPRM-EDA (preparado como se ha descrito anteriormente) seguido de 260 µl de solución de tensioactivo GAFAC® al 1,6 % (0,15 %) con agitación moderada. A un tubo de ensayo pequeño se le añadieron 504 µl de DMSO anhidro, seguido de 60 µl (0,06 mg) de 3-carbamato de vitamina D<sub>3</sub> activado preparado como se ha descrito anteriormente; y la mezcla se añadió a la mezcla de perlas EPRM-EDA. El contenido total de DMSO de la suspensión de perlas fue del 20 %. El recipiente de reacción se dejó en agitación durante la noche a temperatura ambiente. Después, las perlas se lavaron por medio de diafiltración.

25 Se llevó cada lote de perlas hasta un volumen de trabajo de 20 ml con MeOP al 10 %/GAFAC® al 1 %/tampón MES pH6. La mezcla se diafiltró con 5 volúmenes del tampón y después se sometió a tratamiento con ultrasonidos con un aparato de ultrasonidos de sonda a 18-21 vatios usando hielo para mantener la mezcla fría. La diafiltración/tratamiento con ultrasonidos continuó a través de 50 volúmenes con muestras de efluente tomadas a 35, 40, 45 y 50 volúmenes. El tampón se cambió a Tampón de Lavado de Hapteno LOCI (HEPES 50 mM, NaCl 300 mM, EDTA 1 mM, sulfato de neomicina al 0,01 %, TRITON® 405X al 0,1 % y PROCLIN® 300 al 0,15 %, pH 7,2) usándose 10 volúmenes. La mezcla se redujo a aproximadamente 7 ml y se realizó una UP. Los tamaños de partícula fueron de 3323-064A = 289 nm y 3323-064B = 298 nm. Se determinaron los porcentajes de sólidos y se llevó el lote de perlas hasta 10 mg/ml con Tampón de Lavado de Hapteno LOCI pH 7,2. El rendimiento fue de 160,4 mg.

#### Ensayo para no epi-Vitamina D y epi-vitamina D

35 Los ensayos se realizaron en un analizador DIMENSION® VISTA® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, IL) siguiendo el protocolo para un ensayo LOCI y usando soluciones de calibrador que contenían cantidades variables de no epi-25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> y/o 3-epi-25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>. En este ejemplo, el ensayo usa, como reactivo quimioluminiscente, el reactivo chemibead preparado como se ha descrito anteriormente. Las porciones de muestra se hacen reaccionar con (i) el primer reactivo de anticuerpo biotinilado (primera porción de muestra) preparado como se ha descrito anteriormente o (ii) el primer anticuerpo biotinilado y un segundo anticuerpo (segunda porción de muestra) y después con el reactivo chemibead. Para la segunda porción de muestra, el segundo anticuerpo es una solución (0,8 ml a 2,63 mg/ml) de anticuerpo 10H9 de vitamina D (monoclonal de ratón descubierto en el ensayo de vitamina D CENTAUR®, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark DE); el segundo anticuerpo estaba presente en una cantidad en exceso (75 µg/ml o 100 veces la del anticuerpo 5H10). Las chemibeads se unen a la fracción de los sitios de unión del anticuerpo monoclonal que no están ocupados por el analito de la muestra. Posteriormente, se añaden perlas sensibilizantes acopladas a estreptavidina a la mezcla de reacción. Esto conduce a la formación de pares chemibead/sensibead cuya concentración está inversamente relacionada con una concentración de ambas formas de la vitamina D (primera porción de muestra) o la forma epi de la vitamina D (segunda porción de muestra). Tras la iluminación a 680 nm, las perlas sensibilizadoras generan oxígeno singlete que difunde en las chemibeads que están apareadas con sensibeads, reaccionan con el colorante olefínico y desencadena una señal quimioluminiscente a aproximadamente 612 nm que está inversamente relacionada con la concentración del analito.

55 La perla sensibilizadora a estreptavidina ("sensibead o sensibeads") se prepara usando un método análogo al descrito en las Patentes de los EE.UU. N.º 6.153.442, 7.022.529, 7.229.842 y la publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 20050118727A. El fotosensibilizador era bis-(trihexil)-silicon-t-butil-ftalocianina. La concentración del reactivo sensibead era de 200 µg/ml en tampón HEPES, pH 8,0 que contiene NaCl 150 mM. El reactivo de partícula de EPRM-EDA-25-OH Vitamina D<sub>3</sub> preparado como se ha descrito anteriormente se empleó como el "reactivo chemibead" a una concentración de 200 µg/ml en tampón HEPES, pH 7,2, que contenía NaCl 150 mM y detergente al 0,1 %.

5 Para una porción de muestra respectiva, en el instante  $t =$  cero segundos, se añadieron 20  $\mu$ l de reactivo de anticuerpo biotinilado y 20  $\mu$ l de agua a un recipiente de reacción. Se añadió una muestra de 12  $\mu$ l 21,6 segundos más tarde, seguida de 8  $\mu$ l de agua. A  $t =$  414,0 segundos, se le añadieron 40  $\mu$ l de reactivo chemibead seguido de 20 ml de agua. Después, el reactivo sensibead se dispensó a 457,2 segundos. Las mediciones se tomaron 601,2 segundos después del inicio de la secuencia de reacción. Se obtuvieron un primer valor de medición que representaba una cantidad de las formas tanto epi como no epi de vitamina D y un segundo valor de medición que representaba una cantidad de solamente la forma epi de vitamina D.

10 Usando el formato de ensayo anterior, los ensayos se realizaron en muestras de suero con adiciones de cantidades variables de no-epi-25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> (no epi-VD) pero no de 3-epi-25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> (3-epi-VD). Este conjunto de ensayos se realizó para calibrar el instrumento y las muestras que contenían o no el segundo anticuerpo 10H9. Los resultados se resumen en la Tabla 1 a continuación y se representan en un gráfico representado en la Fig. 3.

Tabla 1

Ab 10H9 ausente no-epi-VD (ng/ml)	Ab 10H9 presente no-epi-VD (ng/ml)
0,0	0,0
9,2	7,5
19,6	10,8
71,6	19,7
167	29,1

15 Los resultados muestran que el ensayo todavía detecta algo de no-epi-VD incluso con una cantidad en exceso del segundo anticuerpo 10H9 presente. Por tanto, los resultados obtenidos en otros ensayos que emplean el segundo anticuerpo 10H9 en este sistema de instrumentos tendrán que ajustarse para tener en cuenta los resultados de esta calibración.

20 Usando el formato de ensayo anterior, los ensayos se realizaron en muestras de suero con adiciones de cantidades variables de no-epi-VD y con 3-epi-VD. Los ensayos se realizaron tanto con (+10H9) como sin (-10H9) el segundo anticuerpo 10H9. Los valores "Previsto 1" y "Previsto 2" se obtienen con referencia a los gráficos en las Figs. 2 y 3. Los valores son en ng/ml; Dif = diferencia entre el valor de +10H9 y el valor de Previsto 1. "Cantidad añadida" es la cantidad de 3-epi-VD que se añadió en las muestras. Los resultados se resumen en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

-10H9	+10H9	Previsto 1	Dif	3-epi-VD presente	Previsto 2	Cantidad añadida
53	48,5	18	30,6	Sí	170	167
25,2	24,1	12	12,1	Sí	67	70
15,3	14,5	9	5,7	Sí	32	30
10,8	10,6	7	7	Sí	20	10
9,2	7,5	6	1,2	No	0	0
19,6	10,8	10	0,5	No	0	0
71,6	19,7	21	-0,9	No	0	0

25 Usando los datos anteriores en la Tabla 2, se calcula una cantidad corregida de 3-epi-VD de la siguiente manera; la cantidad pronosticada de epímero 3 se enumera en las columnas segunda a columna. Las explicaciones para cada columna de la Tabla 2 anterior son las siguientes:

- 30 Columna 1: -10H9 es 25(OH)D en ng/ml medido en ausencia de Ab 10H9. Esto representa la cantidad total de 25(OH)D ng/ml ( $D_2 + D_3 + 3\text{epi} \times \text{reactividad cruzada}$ )
- Columna 2: +10H9 es 25(OH)D en ng/ml medido en presencia de Ab 10H9. Esto representa la cantidad total suprimida de 25(OH)D ng/ml ( $\text{parcial } D_2 + \text{parcial } D_3 + 3\text{epi} \times \text{reactividad cruzada}$ )
- Columna 3: Previsto 1 es la cantidad de 25(OH)D ng/ml en presencia de 10H9 si no hubiera epímero 3 presente en la muestra ( $\text{parcial } D_2 + \text{parcial } D_3$ )
- Columna 4: Dif es la columna 2 menos la columna 3 =  $3\text{epi} \times \text{reactividad cruzada}$
- 35 Columna 5: Previsto 2 es la columna 4 dividida por la reactividad cruzada o  $(3\text{epi} \times \text{reactividad cruzada})/\text{reactividad cruzada} = 3\text{epi}$  (ng/ml)
- Columna 6: La cantidad añadida es la cantidad de epímero 3 que se añade a la muestra. Esta columna debe compararse con la columna 5 para mostrar qué tan cerca están los resultados en la columna 5 y la columna 6.

40 Los resultados se resumen en la Tabla 3. Corregida significa 25(OH)D ng/ml calculada después de restar el epímero 3 medido ng/ml de la 25(OH)D ng/ml total medida en ausencia de Ab 10H9. CXR significa reactividad cruzada del epímero 3 del ensayo de recipiente de reacción 2 después de eliminar la interferencia del epímero 3. Esto no es lo

## ES 2 691 946 T3

mismo que la reactividad cruzada mencionada anteriormente. La reactividad cruzada en la Tabla 2 es la reactividad cruzada del Ab 5H10 con el epímero 3. La reactividad cruzada en la Tabla 3 es la reactividad cruzada del ensayo después de restar la concentración del epímero 3 de la concentración final de 25(OH)D ng/ml.

				<u>Tabla 3</u>		
-10H9	+10H9	Cantidad añadida	Dif	3-epi-VD presente	Corregido	CRX de 3-epi-VD
53	48,5	167	30,6	Sí	14	3 %
25,2	24,1	70	12,1	Sí	10	2 %
15,3	14,5	30	5,7	Sí	10	3 %
10,8	10,6	10	7	Sí	9	2 %
9,2	7,5	0	1,2	No	0	0
19,6	10,8	0	0,5	No	0	0
71,6	19,7	0	-0,9	No	0	0

- 5 En la Tabla 3, las columnas 1, 2, 3, 4 y 5 corresponden a las columnas 1, 2, 7, 4 y 5 en la Tabla 2, respectivamente. La columna 6 se corrigió, que es 25(OH)D ng/ml sin epímero 3. Básicamente, se representaron valores de 25(OH)D ng/ml para los calibradores L2-L5 frente a las diferencias en ng/ml entre los valores de 25(OH)D en presencia y ausencia del anticuerpo 10H9. Los coeficientes generados a partir de este gráfico se usaron para predecir valores de no epímero 3 de 25(OH)D por las diferencias. Esto se debe a que la diferencia es la señal suprimida que representa la señal del no epímero 3, puesto que el anticuerpo 10H9 solo se une a los no epímeros.
- 10

A menos que se indique lo contrario, los materiales en los experimentos anteriores pueden adquirirse en Sigma-Aldrich Chemical Corporation (San Luis, MO) o Fluka Chemical Corporation (Milwaukee, WI). Las partes y los porcentajes desvelados en el presente documento son en peso en volumen a menos que se indique lo contrario.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de determinación en una muestra de una cantidad de un primer analito isomérico y un segundo analito isomérico, comprendiendo el método:

- 5 (a) medir una cantidad total del primer analito isomérico y el segundo analito isomérico mediante la realización de un ensayo en una porción de la muestra usando un primer anticuerpo que tiene una afinidad de unión para cada uno de entre el primer analito isomérico y el segundo analito isomérico de al menos  $10^7$  litros/mol para obtener un primer valor de medición;
- 10 (b) medir una cantidad del segundo analito isomérico mediante la realización del ensayo en una porción de la muestra usando el primer anticuerpo para obtener un segundo valor de medición, en el que un segundo anticuerpo que tiene una afinidad de unión para el primer analito isomérico de  $10^6$  a  $10^8$  litros/mol y una afinidad de unión para el segundo analito isomérico de menos de  $10^4$  litros/mol se emplea en exceso para bloquear la unión del primer analito isomérico al primer anticuerpo; e
- 15 (c) igualar el segundo valor de medición a una cantidad del segundo analito isomérico en la muestra y restar el segundo valor de medición del primer valor de medición para obtener un valor resultante e igualar el valor resultante a una cantidad del primer analito isomérico en la muestra,

en el que los dos analitos isoméricos son 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> y 3-epi 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el ensayo es un ensayo homogéneo competitivo, un ensayo heterogéneo competitivo, un ensayo homogéneo no competitivo o un ensayo heterogéneo no competitivo.

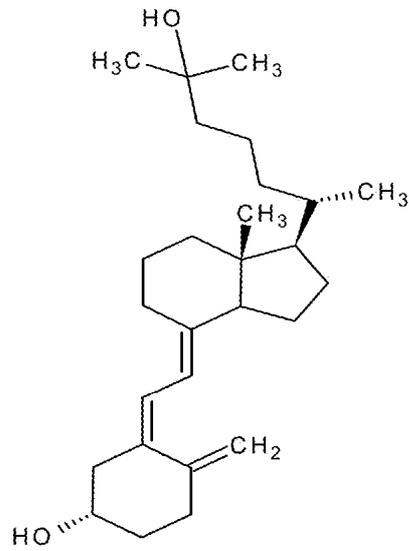
20 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el ensayo emplea reactivos que comprenden un análogo del analito en el que el análogo comprende un marcador.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el ensayo emplea reactivos que comprenden una partícula.

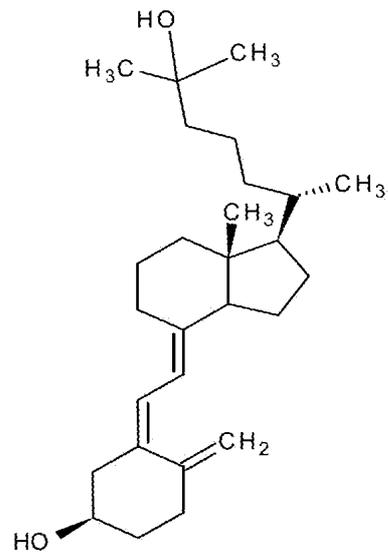
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el ensayo emplea reactivos que comprenden un reactivo fotosensibilizador y una partícula quimioluminiscente.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 5 en el que el reactivo fotosensibilizador comprende una partícula.

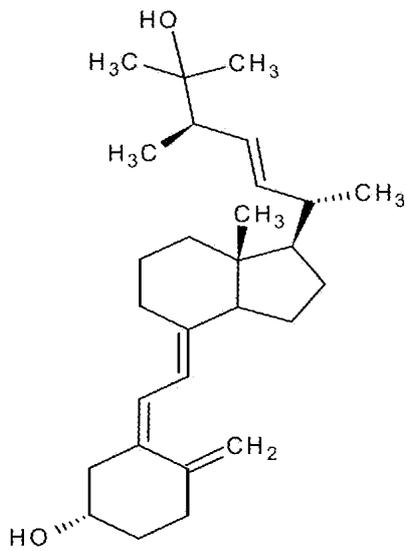
25 7. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el ensayo es un inmunoensayo de canalización de oxígeno luminiscente.



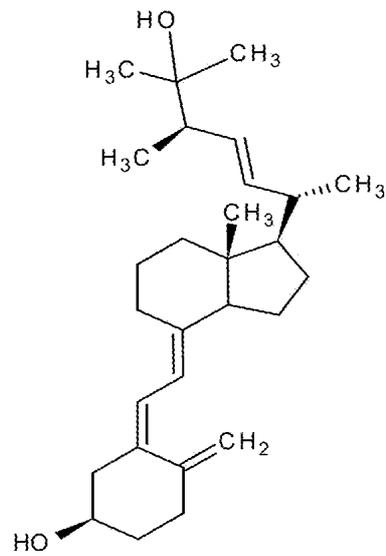
25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>



3-epi-25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>

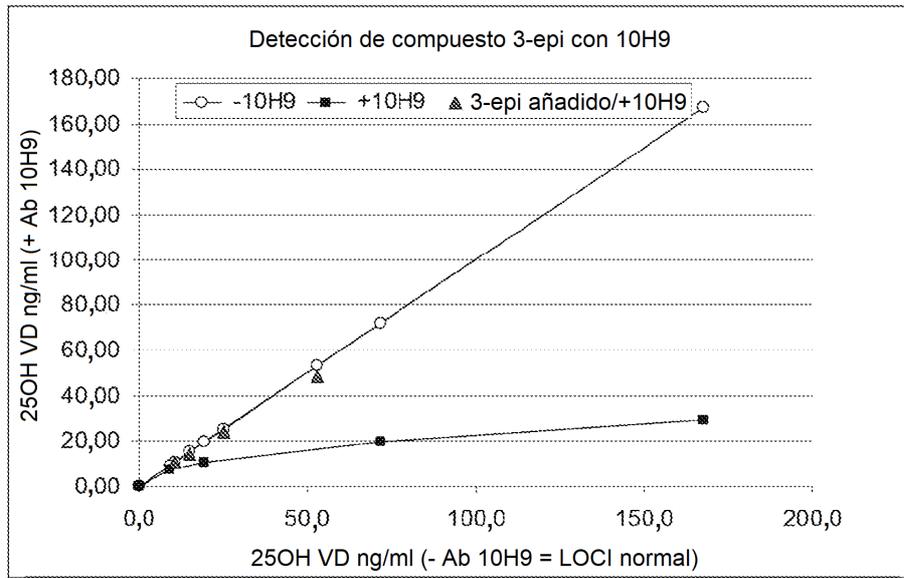


25-hidroxivitamina D<sub>2</sub>

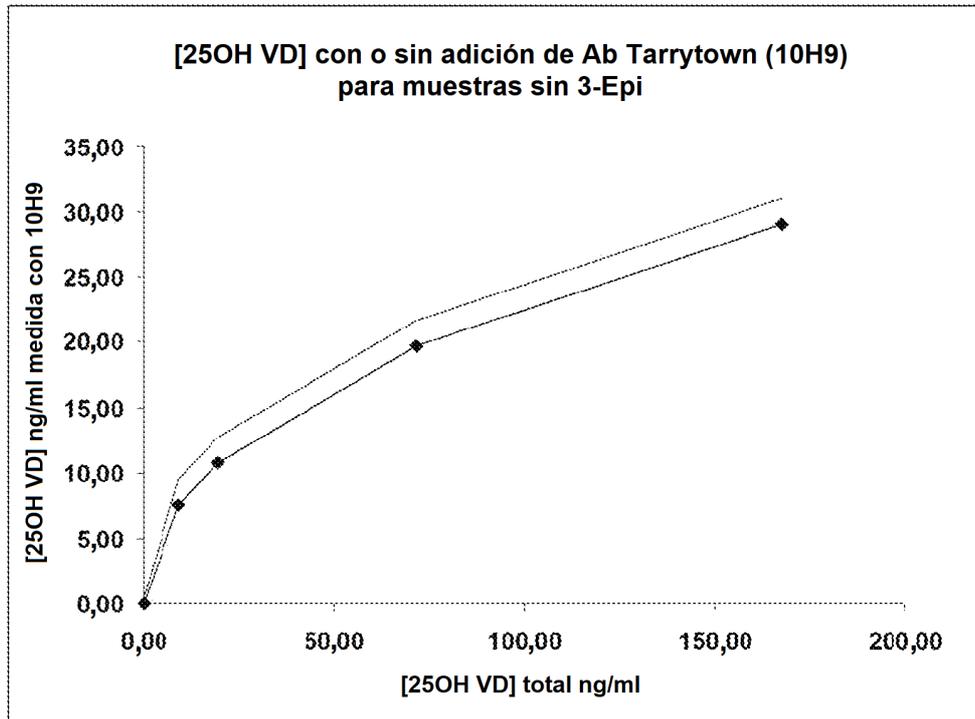


3-epi-25-hidroxivitamina D<sub>2</sub>

**FIG. 1**



**FIG. 2**



*FIG. 3*