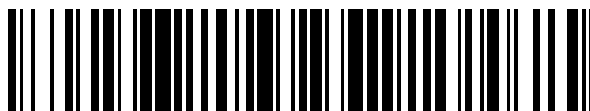


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 518**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/34** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2015** **PCT/US2015/065253**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016** **WO16100117**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2015** **E 15870761 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018** **EP 3234104**

54 Título: **Medición de ensayo precisa de analitos hapténicos hidrófobos**

30 Prioridad:

**17.12.2014 US 201462093105 P**

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

**05.02.2019**

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.**  
**(100.0%)**

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 698 518 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

Medición de ensayo precisa de analitos hapténicos hidrófobos

### Antecedentes

5 La invención se refiere a métodos para la determinación de la concentración de un analito en una muestra que se sospecha que contiene el analito. Más en particular, la invención se refiere a reducir el efecto de las sustancias interferentes sobre las mediciones realizadas durante los métodos anteriores para la determinación de la concentración de un analito en una muestra.

10 Con frecuencia se encuentran compuestos hidrófobos tales como, por ejemplo, fármacos, vitaminas tales como, por ejemplo, la vitamina D y la vitamina B12, y hormonas hapténicas, en el núcleo hidrófobo de las lipoproteínas, cuyo marcador de analito sustituto es el colesterol, que reside en todas las lipoproteínas, incluyendo las lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés), las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés), las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, por sus siglas en inglés), las lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés) y los quilomicrones.

15 Como se ha indicado anteriormente, la vitamina D es uno de esos compuestos hidrófobos. Después de la formación de la vitamina D por la luz UV, es transportada por las lipoproteínas y las proteínas de unión a la vitamina D (VDBP, por sus siglas en inglés) en la sangre. En ensayos para determinar la vitamina D en los que la vitamina D no se extrae usando un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un alcohol, la vitamina D se libera de las VDBP usando un agente de liberación adecuado. Sin embargo, las moléculas de vitamina D en el núcleo de las lipoproteínas se quedan en el núcleo de las lipoproteínas y están intactas en su mayor parte. Los ensayos de extracción son laboriosos y, como se ha mencionado anteriormente, implican el uso de disolventes orgánicos en una muestra. Por tanto, la mayor parte de los inmunoensayos para determinar la vitamina D u otros compuestos hidrófobos se ven afectados negativamente por una o más sustancias interferentes tales como, por ejemplo, el colesterol y las lipoproteínas en una muestra debido a que las moléculas de vitamina D que no se liberan de las sustancias interferentes tales como, por ejemplo, el núcleo de las lipoproteínas, no son accesibles para un anticuerpo utilizado en un inmunoensayo. La cantidad real de vitamina D en una muestra puede no determinarse con precisión y la cantidad de vitamina D observada en un inmunoensayo puede aumentar o suprimirse falsamente.

30 La evaluación 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 los mamíferos. Existe una necesidad continua de desarrollar métodos de diagnóstico rápidos y precisos para medir el nivel de un analito hapténico hidrófobo en una muestra tomada de un paciente. Los métodos deben ser completamente automatizables y precisos, incluso cuando se realicen con muestras que tengan diversas sustancias interferentes. Los métodos de ensayo deben proporcionar una medición precisa de la cantidad del analito hapténico hidrófobo en la muestra minimizando al mismo tiempo las imprecisiones resultantes de las sustancias interferentes presentes en la muestra.

### Sumario

35 Algunos ejemplos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento se refieren a métodos de determinación de una concentración real de un analito hapténico hidrófobo en una muestra desconocida que se sospecha que contiene el analito hapténico hidrófobo, en los que se sospecha que la muestra desconocida contiene una sustancia interferente. Se realiza un primer método de ensayo en una muestra desconocida para obtener una concentración medida del analito hapténico hidrófobo en la muestra desconocida. Se realiza un segundo método de ensayo sobre la muestra desconocida para obtener una concentración de la sustancia interferente en la muestra desconocida. Se aplica una fórmula de corrección predeterminada que utiliza la concentración medida del analito hapténico hidrófobo y la concentración medida de la sustancia interferente obtenida en la etapa (a) para determinar una concentración real del analito hapténico hidrófobo en la muestra desconocida. La fórmula de corrección se predetermina mediante un método que comprende: (i) medir una concentración del analito hapténico hidrófobo para al menos dos muestras diferentes usando el primer método de ensayo y medir la concentración del analito hapténico hidrófobo para las al menos dos muestras diferentes usando un método de referencia en el que las al menos dos muestras diferentes también comprenden la sustancia interferente, (ii) determinar un sesgo entre el primer método de ensayo y el método de referencia en el que el sesgo es la diferencia entre la concentración del analito hapténico hidrófobo determinada mediante el método de referencia y el primer método de ensayo para cada muestra diferente, (iii) medir una concentración de la sustancia interferente para cada una de las al menos dos muestras diferentes y (iv) determinar la fórmula de corrección mediante la realización de un análisis de regresión usando el sesgo y la concentración de la sustancia interferente en cada una de las al menos dos muestras diferentes, en el que el análisis comprende la formación de una línea de regresión y el uso de la pendiente y la intersección de la línea de regresión para formar la fórmula de corrección como se define en la reivindicación 1.

55

Algunos ejemplos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento se refieren a métodos de determinación de una concentración real de un analito de vitamina D en una muestra desconocida que se sospecha que contiene el analito de vitamina D, en el que se sospecha que la muestra desconocida contiene colesterol. Se realiza un primer método de ensayo en una muestra desconocida para obtener una concentración medida del analito de vitamina D en la muestra desconocida. Se realiza un segundo método de ensayo sobre la muestra desconocida para obtener una concentración de colesterol. Se aplica una fórmula de corrección predeterminada que utiliza la concentración medida del analito de vitamina D y la concentración medida de colesterol obtenida en la etapa (a) para determinar una concentración real del analito de vitamina D en la muestra desconocida. La fórmula de corrección se predetermina mediante un método que comprende: (i) medir una concentración del analito de vitamina D para al menos dos muestras diferentes usando el primer método de ensayo y medir la concentración del analito de vitamina D para cada una de las al menos dos muestras usando un método de referencia en el que las muestras también comprenden colesterol, (ii) determinar un sesgo entre el primer método de ensayo y el método de referencia en el que el sesgo es la diferencia entre la concentración del analito de vitamina D determinada mediante el método de referencia y el método de ensayo para cada una de las al menos dos muestras diferentes, (iii) medir una concentración de colesterol en cada una de las al menos dos muestras diferentes y (iv) determinar la fórmula de corrección mediante un análisis de regresión usando el sesgo y la concentración de colesterol en cada una de las al menos dos muestras diferentes, en el que el análisis de regresión comprende formar una línea de regresión y usar la pendiente y la intersección de la línea de regresión para formar la fórmula de corrección como se define en la reivindicación 6.

## Breve descripción de los dibujos

Los dibujos proporcionados en el presente documento no están a escala y se proporcionan con el fin de facilitar la comprensión de determinados ejemplos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento y se proporcionan a modo de ilustración y no de limitación del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

La Fig. 1 es una gráfica que representa el sesgo (obtenido restando los resultados de un ensayo de cromatografía líquida-espectrometría de masas (CLEM) para determinar la vitamina D en un conjunto de muestras de los resultados de un inmunoensayo para la vitamina D en el mismo conjunto de muestras) trazado en función de la concentración de colesterol para cada miembro del conjunto de muestras.

La Fig. 2 es una gráfica que representa el sesgo de la Fig. 1 (corregida basándose en la fórmula de corrección obtenida) trazado en función de la concentración de colesterol para cada miembro del conjunto de muestras.

La Fig. 3 es una gráfica que representa la concentración de vitamina D medida mediante el inmunoensayo (sin la aplicación de la fórmula de corrección) trazada en función de la concentración de vitamina D medida mediante el método de referencia.

La Fig. 4 es una gráfica que representa la concentración de vitamina D medida mediante el inmunoensayo (con la aplicación de la fórmula de corrección) trazada en función de la concentración de vitamina D medida mediante el método de referencia.

## Descripción detallada de realizaciones específicas

### Análisis general

Los ejemplos de métodos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento proporcionan una medición precisa de un analito hapténico hidrófobo en una muestra tomada de un hospedador donde la muestra contiene una o más sustancias interferentes que afectan a la capacidad de detectar con precisión el analito hapténico hidrófobo. En ejemplos de métodos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento, las concentraciones medidas para analitos hapténicos hidrófobos se corrigen midiendo la concentración de analito hapténico hidrófobo en una porción de una muestra desconocida usando un método de ensayo y midiendo la concentración de una sustancia interferente en otra porción de la muestra desconocida usando otro método de ensayo, por lo general diferente, y aplicando una fórmula de corrección predeterminada que utilice ambas mediciones anteriores para obtener una medición precisa del analito hapténico hidrófobo en la muestra desconocida. En algunos ejemplos, la medición de la concentración de la sustancia interferente se realiza como parte de un panel de ensayos que también incluye la medición del analito hidrófobo hapténico.

La fórmula de corrección se predetermina mediante un método que comprende: (i) medir una concentración del analito hapténico hidrófobo para al menos dos muestras diferentes usando el primer método de ensayo y medir la concentración del analito hapténico hidrófobo para cada una de las dos muestras diferentes usando un método de referencia en el que las muestras también comprenden la sustancia interferente, (ii) determinar un sesgo entre el primer método de ensayo y el método de referencia en el que el sesgo es la diferencia entre la concentración del analito hapténico hidrófobo determinada mediante el método de referencia y el primer ensayo método para cada una

de las dos muestras diferentes, (iii) medir una concentración de la sustancia interferente en cada una de las dos muestras diferentes y (iv) determinar la fórmula de corrección mediante la realización de un análisis de regresión usando el sesgo y la concentración de la sustancia interferente para cada una de las al menos dos muestras diferentes.

- 5 El presente inventor descubrió que el uso de una fórmula de corrección como se ha analizado anteriormente da como resultado una determinación más precisa de un analito hapténico hidrófobo si las sustancias interferentes provocan que la medición del ensayo sea demasiado alta o demasiado baja en ausencia de una fórmula de corrección.

10 La frase "analito hapténico hidrófobo" se refiere a un analito que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 2.500, o inferior a aproximadamente 2.000, o inferior a aproximadamente 1.500, o inferior a aproximadamente 1.000, o inferior a aproximadamente 500 y que está en el intervalo de pesos moleculares de aproximadamente 100 a aproximadamente 2.500, o de aproximadamente 300 a aproximadamente 2.500, o de aproximadamente 300 a aproximadamente 2.000, o de aproximadamente 300 a aproximadamente 1.500, o de aproximadamente 300 a aproximadamente 1.000, o de aproximadamente 500 a aproximadamente 2.500, o de aproximadamente 500 a aproximadamente 2.000, o de aproximadamente 500 a aproximadamente 1.500, o de aproximadamente 500 a aproximadamente 1.000, por ejemplo. El analito hapténico hidrófobo es soluble en grasa, lo que significa que el analito hapténico hidrófobo es soluble en uno o más entre grasas, aceites y lípidos, por ejemplo.

20 En algunos ejemplos, los analitos hapténicos hidrófobos incluyen, entre otros, vitaminas, drogas de abuso, fármacos terapéuticos y hormonas esteroideas, por ejemplo. Las vitaminas incluyen, entre otras, la vitamina D, la vitamina B12, la vitamina E y la vitamina K, por ejemplo. Las hormonas esteroideas incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, progestágenos, estrógenos, andrógenos, glucoesteroides, mineralocorticoides y secoesteroides, por ejemplo. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento, el analito hapténico hidrófobo es la vitamina D, por ejemplo.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "vitamina D" se refiere a un grupo de secoesteroides solubles en grasa e incluye, por ejemplo, uno o más de entre 25-hidroxicolecalciferol (también denominado calcidiol, calcifediol, 25-hidroxicolecalciferol o 25-hidroxivitamina D (abreviada 25(OH)D) que incluye 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> y 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub>; calcidiol; 1,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> (calcitriol; 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>); 1,25-dihidroxi vitamina D<sub>4</sub>; 1,25-dihidroxi vitamina D<sub>5</sub>; y 1,25-dihidroxi vitamina D<sub>6</sub>; incluyendo uno o más metabolitos de todos los anteriores.

30 La muestra que se ha de analizar es una que se sospecha que contiene un analito hapténico hidrófobo y una o más sustancias interferentes. Las muestras pueden ser muestras biológicas o muestras no biológicas. Las muestras biológicas pueden ser de un sujeto mamífero o no mamífero. Los sujetos mamíferos pueden ser, por ejemplo, seres humanos u otras especies animales. "Muestras no biológicas" son aquellas que no se relacionan con un material biológico e incluyen, por ejemplo, muestras de suelo, flujos de desechos, muestras de agua, muestras de aire, muestras de gases distintos del aire y muestras de minerales. La frase "muestra biológica" se refiere a cualquier material biológico tal como, por ejemplo, un fluido corporal, un tejido corporal, compuestos corporales y medios de cultivo. La muestra puede ser un sólido, semisólido o un fluido (un líquido o un gas) de cualquier fuente. En algunas realizaciones, la muestra puede ser una excreción corporal, un producto de aspiración corporal, un producto de excisión corporal o un producto de extracción corporal. El cuerpo suele ser el de un mamífero y, en algunas realizaciones, el cuerpo es un cuerpo humano. Las excreciones corporales son aquellas sustancias que se excretan de un cuerpo (aunque también pueden obtenerse por excisión o extracción) tales como, por ejemplo, orina, heces, heces, mucosidad vaginal, semen, lágrimas, aliento, sudor, fluido de ampollas y exudados inflamatorios. Los productos de excisión corporales son aquellos materiales que se extirpan de un cuerpo tales como, por ejemplo, muestras de piel, cabello y tejidos, incluyendo biopsias de órganos y otras partes del cuerpo. Los productos de aspiración corporales son aquellos materiales que se aspiran de un cuerpo tales como, por ejemplo, moco, saliva y esputo. Los productos de extracción corporales son aquellos materiales que se extraen de un cuerpo tales como, por ejemplo, sangre entera, plasma, suero, fluido espinal, fluido cefalorraquídeo, fluido linfático, fluido sinovial y fluido peritoneal. En algunos ejemplos, la muestra es sangre entera, plasma o suero.

50 La frase "sustancias interferentes" se refiere a uno o más compuestos que interactúan con un analito hapténico hidrófobo y hacen que el analito hapténico hidrófobo no esté disponible para unirse a un compañero de unión tal como un anticuerpo para el analito hapténico hidrófobo que se usa en un ensayo para la determinación del analito hapténico hidrófobo. Dichas sustancias interferentes incluyen, pero no se limitan a, colesterol, que reside en todas las lipoproteínas incluyendo LDL, VLDL, IDL, HDL y quilomicrones, por ejemplo.

#### Determinación de la fórmula de corrección

55 Los ejemplos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento tienen una aplicación particular en ensayos de analitos hapténicos hidrófobos en los que las sustancias que interfieren afectan a la precisión de la medición. Como se ha mencionado anteriormente, se emplea una fórmula de corrección predeterminada para corregir una medición de ensayo para un resultado impreciso debido a la presencia de una o

más sustancias interferentes en la muestra que se somete a ensayo. En ejemplos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento, un método para predeterminar una fórmula de corrección comprende medir una concentración del analito hapténico hidrófobo para al menos dos muestras diferentes usando un primer método de ensayo y medir la concentración del analito hapténico hidrófobo usando un método de referencia para cada una de las al menos dos muestras diferentes en las que cada una de las muestras también comprende la sustancia interferente.

Una fórmula de corrección predeterminada se determina, por ejemplo, por un fabricante o un desarrollador, para cada ensayo que puede usarse para determinar una concentración de un analito hidrófobo hapténico en una muestra desconocida de un hospedador. Una vez predeterminada, la fórmula de corrección puede diseminarse, por ejemplo, mediante la inclusión con instrucciones para un ensayo, a un usuario tal como, por ejemplo, un laboratorio, para su uso en la determinación de concentraciones de analito hapténico hidrófobo en muestras desconocidas. El usuario simplemente aplica la fórmula de corrección predeterminada a los resultados del ensayo obtenidos para el análisis posterior de muestras desconocidas con el fin de calcular una concentración precisa de un analito hidrófobo hapténico en las muestras desconocidas.

En la predeterminación de la fórmula de corrección, el número de muestras diferentes que contienen el analito hapténico hidrófobo que se someten al primer método de ensayo es al menos dos o al menos tres o al menos cuatro o al menos cinco o al menos seis. En algunos ejemplos, el número de muestras diferentes que contienen el analito hapténico hidrófobo que puede emplearse es de entre 2 y 20, o entre 2 y 15, o entre 2 y 14, o entre 2 y 13, o entre 2 y 12, o entre 2 y 11, o entre 2 y 10, o entre 3 y 20, o entre 3 y 15, o entre 3 y 14, o entre 3 y 13, o entre 3 y 12, o entre 3 y 11, o entre 3 y 10, o entre 4 y 20, o entre 4 y 15, o entre 4 y 12, o entre 4 y 10, o entre 5 y 20, o entre 5 y 15, o entre 5 y 12, o entre 5 y 10, o entre 6 y 15, o entre 6 y 14, o entre 6 y 13, o entre 6 y 12, o entre 7 y 15, o entre 7 y 14, o entre 7 y 13, o entre 7 y 12, o entre 8 y 20, o entre 8 y 15, o entre 8 y 12, por ejemplo.

En algunos ejemplos, las concentraciones de analitos hapténicos hidrófobos empleadas abarcan el intervalo de concentración esperado de los analitos hapténicos hidrófobos en muestras desconocidas que se han de analizar. La concentración del analito hapténico hidrófobo que puede someterse a ensayo generalmente varía de aproximadamente  $10^{-5}$  a aproximadamente  $10^{-17}$  M, o de aproximadamente  $10^{-6}$  a aproximadamente  $10^{-14}$  M, o de aproximadamente  $10^{-8}$  M a aproximadamente  $10^{-10}$  M, por ejemplo. La concentración de la sustancia interferente en cada una de las muestras puede variar entre aproximadamente 10 mg/dl y aproximadamente 1.000 mg/dl, o de aproximadamente 50 mg/dl a aproximadamente 1.000 mg/dl, o de aproximadamente 100 mg/dl a aproximadamente 1.000 mg/dl, o de aproximadamente 200 mg/dl a aproximadamente 1.000 mg/dl, o de aproximadamente 300 mg/dl a aproximadamente 1.000 mg/dl, o de aproximadamente 500 mg/dl a aproximadamente 1.000 mg/dl, o de aproximadamente 10 mg/dl a aproximadamente 500 mg/dl, o de aproximadamente 50 mg/dl a aproximadamente 500 mg/dl, o de aproximadamente 100 mg/dl a aproximadamente 500 mg/dl, o de aproximadamente 200 mg/dl a aproximadamente 500 mg/dl, o de aproximadamente 300 mg/dl a aproximadamente 500 mg/dl, por ejemplo.

El primer método de ensayo empleado para predeterminar una fórmula de corrección es el método de ensayo que se emplearía posteriormente para medir muestras que se sospeche que contienen un analito hapténico hidrófobo, es decir, muestras desconocidas. Puede emplearse cualquier método de ensayo como primer método de ensayo. En algunos ejemplos, el primer método de ensayo comprende añadir reactivos para determinar la concentración del analito hidrófobo en la muestra a un medio que comprende la muestra en la que los reactivos comprenden al menos un compañero de unión para el analito hidrófobo, e incubar el medio en condiciones para la unión del analito hidrófobo al compañero de unión para el analito hidrófobo. La unión da como resultados complejos que comprenden el compañero de unión para el analito y el analito o un análogo de analito. La cantidad de dichos complejos se mide y se relaciona con la cantidad del analito en la muestra.

La frase "compañero de unión" se refiere a una molécula que es un miembro de un par de unión específico, que es una de dos moléculas diferentes que se une específicamente y, por tanto, se define como complementaria con la otra molécula. Por ejemplo, un miembro del par de unión específico puede tener un área sobre la superficie o en una cavidad que se une específicamente a una organización espacial y polar particular del otro miembro del par de unión específico. El compañero de unión puede ser, a modo de ilustración y no de limitación, un anticuerpo o un aptámero (por ejemplo, un aptámero de ácido nucleico o un aptámero peptídico), por ejemplo.

Los ensayos que emplean un anticuerpo como un reactivo se denominan inmunoensayos. La frase "anticuerpo para el analito" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a un analito (y, en algún ejemplo, a análogos estructurales del analito estrechamente relacionados, tales como los metabolitos del analito) y no se une en ningún grado significativo a otras sustancias que distorsionarían el análisis para el analito. En consecuencia, la unión específica implica el reconocimiento específico de una de dos moléculas diferentes por la otra en comparación con el reconocimiento sustancialmente menor de otras moléculas. Por otro lado, la unión no específica implica una unión no covalente entre moléculas que es relativamente independiente de estructuras superficiales específicas. La unión no específica puede ser resultado de varios factores, incluyendo las interacciones hidrófobas entre las moléculas.

En general, un ensayo empleado como primer método de ensayo para predeterminar una fórmula de corrección de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento se realiza combinando en un medio de ensayo una muestra que contiene el analito hidrófobo hapténico y un anticuerpo para el analito hidrófobo hapténico. El anticuerpo puede emplearse en un modo libre o uno conjugado. Un anticuerpo conjugado es un anticuerpo que está unido a un soporte o un marcador, o a una combinación de un soporte y un marcador, por ejemplo. La naturaleza de otros reactivos empleados depende del tipo particular de ensayo que se ha de realizar. La combinación en el medio se somete a condiciones para la unión del analito, o un análogo del analito, al anticuerpo para formar un complejo. La cantidad del complejo se mide cuando la cantidad del complejo se relaciona con la cantidad de analito en el medio.

Un "análogo de analito" es un analito modificado que compite con el analito por unirse a un receptor tal como un anticuerpo para el analito. La modificación proporciona medios para unir un análogo de analito a otra molécula. El análogo del analito por lo general diferirá del analito en más que el reemplazo de un hidrógeno por un enlace que une el análogo del analito a un centro o marcador, pero no es necesario. El análogo de analito puede ser, por ejemplo, el analito conjugado con otra molécula tal como, por ejemplo, un marcador o un soporte, a través de un enlace o un grupo de enlace, por ejemplo.

Un ensayo puede realizarse ya sea sin separación (homogéneo) o con separación (heterogéneo) de cualquiera de los componentes o productos del ensayo. Los ensayos heterogéneos por lo general implican una o más etapas de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Los inmunoensayos pueden implicar reactivos marcados o no marcados. Los inmunoensayos que implican reactivos no marcados generalmente comprenden la formación de complejos relativamente grandes que implican uno o más anticuerpos preparados a partir de conjugados inmunógenos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, métodos de inmunoprecipitación y aglutinación y técnicas correspondientes de dispersión de la luz tales como, por ejemplo, nefelometría y turbidimetría, para la detección de complejos de anticuerpos. Los inmunoensayos marcados incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayos de quimioluminiscencia, inmunoensayos enzimáticos, inmunoensayos de polarización de fluorescencia, radioinmunoensayos, ensayos 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. Otro grupo de inmunoensayos implica el uso de un exceso de uno o más de los reactivos principales. Otro grupo de inmunoensayos son ensayos homogéneos sin separación en los que un reactivo marcado modula la señal del marcador tras la unión de un analito o análogo de analito a un anticuerpo 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 del ensayo. Se ejemplifican inmunoensayos homogéneos 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, de la columna 3, línea 6, a la columna 6, línea 64; métodos de inmunofluorescencia tales como los desvelados en Ullman, et al., Patente de los EE.UU. N.º 3.996.345, de la columna 17, línea 59, a la 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 EE.UU. N.º 4.233.402, de la columna 6, línea 25, a la columna 9, línea 63; el inmunoensayo de polarización de fluorescencia ("FPIA", por sus siglas en inglés) como se desvela, por ejemplo, entre otros, en la Patente de los EE.UU. N.º 5.354.693; e inmunoensayos enzimáticos tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas ("ELISA"). Son ejemplos de ensayos heterogéneos el radioinmunoensayo, desvelado en Yalow, et al., *J. Clin. Invest.* 39: 1157 (1960).

Otros inmunoensayos enzimáticos son el inmunoensayo mediado por modulador enzimático ("EMMIA", por sus siglas en inglés) analizado por Ngo y Lenhoff, *FEBS Lett.* (1980) 116: 285-288; el inmunoensayo de fluorescencia marcado con sustrato ("SLFIA", por sus siglas en inglés) desvelado por Oellerich, *J. Clin. Chem. Clinica Biochem.* (1984) 22: 895-904; los inmunoensayos de donadores de enzimas combinados ("CEDIA", por sus siglas en inglés) desvelados por Khanna, et al., *Clin. Chem. Acta* (1989) 185: 231-240; inmunoensayos homogéneos marcados con partículas homogéneas, tales como inmunoensayos de inhibición turbidimétricos potenciados por partículas ("PETINIA", por sus siglas en inglés), e inmunoensayo turbidimétrico potenciado por partículas ("PETIA", por sus siglas en inglés); 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 de membrana enzimática ("EMIA", por sus siglas en inglés); y los luminoinmunoensayos ("LIA", por sus siglas en inglés); por ejemplo. Otros tipos de ensayos incluyen ensayos de inmunosensores que implican el control de los cambios en las propiedades ópticas, acústicas y eléctricas de un compuesto en la unión a un anticuerpo. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunosensores ópticos, ensayos de inmunosensores acústicos, ensayos de inmunosensores semiconductores, ensayos de inmunosensores transductores electroquímicos, ensayos de inmunosensores potenciométricos y ensayos de electrodos amperométricos.

Los ensayos heterogéneos por lo general implican una o más etapas de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Una diversidad de formatos de ensayo heterogéneos competitivos y no competitivos se desvelan en Davalian, et al., Patente de los EE.UU. N.º 5.089.390, de la columna 14, línea 25, a la columna 15, línea 9. En un ejemplo de un ensayo heterogéneo competitivo, un soporte que tiene un anticuerpo para un analito unido al mismo se pone en contacto con un medio que contiene la muestra que se sospecha que contiene el analito y un análogo de analito marcado. El analito en la muestra compite con el análogo de analito, que puede llevar un marcador detectable, para unirse al anticuerpo para el analito. Después de separar el soporte y el medio, la actividad del marcador del soporte o el medio se determina mediante técnicas convencionales y se relaciona con la cantidad de analito en la muestra.

El medio empleado en un método de ensayo para predeterminar una fórmula de corrección de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento es 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. El pH generalmente 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 productor de señales, etc. Pueden usarse diversos tampones para conseguir el pH deseado y mantener el pH durante el ensayo. Los tampones ilustrativos incluyen borato, fosfato, carbonato, tris, barbitol, TUBOS, HEPES, MES, ACES, MOPS, BICINA y similares. El tampón particular empleado no es crítico, pero en un ensayo individual puede preferirse uno u otro tampón.

Pueden emplearse diversos materiales complementarios en los métodos de ensayo. Por ejemplo, además de los 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 albúminas; disolventes orgánicos tales como formamida; sales de amonio cuaternario; polianiones tales como sulfato de dextrano; potenciadores de unión, por ejemplo, polialquilenglicoles; polisacáridos tales como dextrano, trehalosa o similares. El medio también puede comprender agentes para prevenir la formación de coágulos de sangre. Dichos agentes son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, EDTA, EGTA, citrato, heparina y similares. El medio también puede comprender uno o más conservantes como se conocen en la técnica, tales como, por ejemplo, azida de sodio, sulfato de neomicina, PROCLIN® 300, estreptomina y similares. Cualquiera de los materiales anteriores, si se emplea, está presente en una concentración o cantidad suficiente para conseguir el efecto o función deseados.

Dependiendo de la naturaleza del ensayo empleado, el medio puede comprender uno o más componentes tales como, por ejemplo, otros miembros de un sistema de producción de señales del que forma parte el marcador.

El sistema productor de señales puede tener uno o más componentes, siendo al menos un componente un marcador. El sistema productor de señales genera una señal que se relaciona con la presencia de un analito hapteno hidrófobo en una muestra. El sistema de producción de señales incluye todos los reactivos necesarios para producir una señal medible. Pueden incluirse otros componentes del sistema productor de señales 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 señales, por ejemplo. Otros componentes del sistema productor de señales pueden ser coenzimas, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, otras enzimas y catalizadores, por ejemplo. El sistema productor de señales proporciona una señal detectable por medios externos, mediante el uso de radiación electromagnética, deseablemente por examen visual. Se describen sistemas de producción de señales de ejemplo 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. La expresión "marcadores no de poli(aminoácidos)" incluye los marcadores que no son proteínas. El marcador no de poli(aminoácidos) puede detectarse directamente o es detectable a través de una reacción que produce una señal detectable. El marcador no de poli(aminoácidos) 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, ésteres de acridinio, compuestos fluorescentes y compuestos quimioluminiscentes, por ejemplo), un polinucleótido que codifica un catalizador, un promotor, un colorante, una coenzima, un sustrato enzimático, un grupo radiactivo y una secuencia de polinucleótidos amplificable, por ejemplo. En algunos ejemplos, los marcadores que no son de poli(aminoácidos) son radioisotópicos, luminiscentes (tales como, por ejemplo, ésteres de acridinio), están en forma de partículas (tales como, por ejemplo, partículas magnéticas que pueden separarse entre unidas y sin unir, partículas de látex que pueden medirse por turbidez y nefelometría, y perlas de quimioluminiscencia (por ejemplo, quimioperlas LOCI), por ejemplo.

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

En algunas realizaciones de ensayos conocidos, los miembros del sps comprenden un sensibilizador tal como, por ejemplo, un fotosensibilizador y una composición 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 de sps unido y/o sin unir, es decir, la cantidad de miembro del sps unido o sin unir al analito que se detecta o a un agente que refleja la cantidad del analito que se ha de detectar. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento, uno de los reactivos sensibilizadores o el reactivo de quimioluminiscencia es un reactivo conjugado preparado de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento. Son ejemplos de fotosensibilizadores y reactivos quimioluminiscentes que pueden utilizarse los que se exponen en las Patentes de los EE.UU. N.º 5.340.716 y 6.251.581.

En un ejemplo particular, a modo de ilustración y no de limitación, puede emplearse 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). El ensayo emplea un reactivo fotosensibilizador y un reactivo quimioluminiscente. En un enfoque, el ensayo utiliza, como reactivo fotosensibilizador, un conjugado de partículas marcado donde el marcador del conjugado de partículas es un fotosensibilizador. El reactivo quimioluminiscente comprende un anticuerpo para el analito. El analito compite con el conjugado de partículas, que comprende un análogo de analito, por el anticuerpo para el analito. Si el analito está presente, menor es el número de moléculas de conjugado de partículas marcado que se acercan al compuesto quimioluminiscente. Por tanto, habrá una disminución en la señal de 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. La cantidad de luz producida se relaciona con la cantidad del complejo formado, que a su vez se relaciona con la cantidad de analito presente en la muestra.

Las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo generalmente se determinarán por el intervalo de concentraciones 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 importante debe proporcionar una diferencia de señal medible con precisión. Consideraciones tales como la naturaleza del sistema productor de señales y la naturaleza de los analitos normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

Como se ha mencionado anteriormente, la muestra y los reactivos se proporcionan en combinación en el medio. Aunque el orden de 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 pueden combinarse secuencialmente. En algunas realizaciones, puede haber implicada una etapa de incubación posteriormente a cada adición, como se explica a continuación. En ensayos heterogéneos, también pueden emplearse etapas de lavado después de una o más etapas de incubación.

Pueden aplicarse uno o más períodos de incubación al medio en uno o más intervalos, incluyendo cualquier intervalo entre las adiciones de diversos reactivos 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. Normalmente se emplean temperaturas moderadas para realizar un ensayo y, por lo general, a una temperatura constante, preferentemente a temperatura ambiente, durante el período de medición. Las temperaturas de incubación normalmente varían 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. El período de tiempo depende de la temperatura del medio y la velocidad de unión de los diversos reactivos. Las temperaturas durante las mediciones generalmente variarán entre aproximadamente 10 °C y aproximadamente 50 °C, o entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 40 °C, por ejemplo.

En una siguiente etapa de un método de ensayo, el medio se examina para determinar la presencia de un complejo que comprende el analito y el anticuerpo para el analito. La cantidad del complejo indica la cantidad del analito en la muestra. En muchas realizaciones, el examen del medio implica la detección de una señal del medio. La cantidad de la señal está relacionada con la presencia y/o la cantidad del analito en la muestra. El modo particular de detección depende de la naturaleza de los sps. Como se ha analizado anteriormente, existen numerosos métodos por los que un marcador de un sps puede producir una señal detectable por medios externos. La activación de un sistema productor de señales depende de la naturaleza de los miembros del sistema productor señales.



Las temperaturas durante las mediciones generalmente varían de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 70 °C o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 45 °C o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C. En un enfoque, se forman curvas patrón usando concentraciones conocidas del analito. También pueden usarse calibradores y otros controles.

La luminiscencia o la luz producidas 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 determinar la cantidad de las mismas, que se relaciona con la cantidad de analito en el medio. El examen para determinar la presencia y/o cantidad de la señal también incluye la detección de la señal, que generalmente es simplemente una etapa en la 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 sin limitación, un espectrofotómetro, un fluorómetro, un espectrómetro de absorción, un luminómetro y un quimioluminómetro, por ejemplo.

Como se ha mencionado anteriormente, para la predeterminación del factor de corrección, la concentración del analito hapténico hidrófobo en una muestra se realiza en una porción de la muestra mediante un primer método de ensayo y en una porción de la misma muestra mediante un método de referencia. Estas determinaciones se realizan para cada una de las muestras que se emplean en la predeterminación de la fórmula de corrección de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento. El método de referencia es un método para la determinación de un analito que es diferente del primer método de ensayo empleado en la medición de las concentraciones del analito hapténico hidrófobo en cada una de las diferentes muestras como se ha analizado anteriormente. El método de referencia debe ser uno que mida directamente un carácter específico del analito o sus derivados, por ejemplo, la relación m/z medida mediante un método de espectrometría de masas. Los ejemplos de métodos de referencia que pueden emplearse incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, espectrometría de masas, cromatografía líquida incluyendo cromatografía líquida de alto rendimiento, por ejemplo, electroforesis, microfluidos, microscopía, espectroscopia, ensayos químicos, inmunoensayos y una combinación de dos o más de los mismos.

Una vez que las concentraciones de analito hapténico hidrófobo se han medido al menos mediante el primer método de ensayo y el método de referencia para cada una de las diferentes muestras empleadas, se determina un sesgo entre el primer método de ensayo y el método de referencia. El sesgo es la diferencia entre la concentración del analito hapténico hidrófobo determinada mediante el método de referencia y el primer método de ensayo para cada una de las diferentes muestras que contienen el analito hidrófobo.

Además de la medición de las concentraciones de analito hapténico hidrófobo usando el primer método de ensayo y el método de referencia en cada una de las diferentes muestras, también se realizan mediciones de la concentración de sustancia interferente en cada una de las diferentes muestras. La medición de las concentraciones de la sustancia interferente en las diferentes muestras puede realizarse usando un método de ensayo para determinar la sustancia interferente. El método de ensayo puede elegirse entre cualquiera de los primeros métodos de ensayo o métodos de referencia mencionados anteriormente. Las diferentes muestras analizadas deben abarcar un amplio intervalo de concentraciones de sustancia interferente, de manera que la fórmula de corrección generada de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento pueda emplearse para el análisis posterior de un amplio intervalo de concentraciones de sustancia interferente encontrada para una gran población de pacientes. Esto puede conseguirse, por ejemplo, analizando un número de muestras superior al número necesario para generar la fórmula de corrección (véase el análisis anterior para conocer el número de muestras que contienen analito hapténico hidrófobo que se usan para generar la fórmula de corrección) y seleccionando, entre las muestras, aquellas muestras que proporcionan un amplio intervalo para la concentración de sustancia interferente.

La fórmula de corrección se determina mediante un análisis de regresión usando el sesgo y la concentración de la sustancia interferente en cada una de las diferentes muestras. El análisis de regresión es uno que se centra en la relación entre una variable dependiente y una o más variables independientes. Puede emplearse cualquier análisis de regresión adecuado, tal como, pero no limitado a, análisis de regresión lineal, alto orden de regresión polinómica, regresión de mínimos cuadrados ordinaria, regresión de Passing-Bablok y regresión de Deming (ponderada o no ponderada), por ejemplo.

En un ejemplo a modo de ilustración y no de limitación, el análisis de regresión comprende formar una línea de regresión como en la regresión lineal y desarrollar una fórmula de corrección a partir de la pendiente y la intersección de la línea de regresión. En este ejemplo, para cada muestra diferente, el sesgo obtenido como se ha descrito anteriormente se representa en función de la concentración de la sustancia interferente obtenida como se ha descrito anteriormente. Puede desarrollarse la siguiente relación o fórmula de corrección:  $[An] = [Anm] + (a \times [SIm] + b)$  en la que  $[An]$  es la concentración real del analito hidrófobo en la muestra desconocida,  $[Anm]$  es la concentración medida del analito hidrófobo en una muestra desconocida,  $[SIm]$  es la concentración medida de la sustancia interferente en la muestra desconocida,  $a$  es la pendiente de la línea de regresión y  $b$  es la intersección de la línea de regresión. Por tanto, un usuario como un laboratorio puede usar la fórmula de corrección anterior para determinar con precisión la concentración de un analito hapténico hidrófobo usando el ensayo para el que estaba

predeterminada la fórmula de corrección. Después de realizar el ensayo, la concentración medida del analito hapténico hidrófobo y la concentración medida de la sustancia interferente en la muestra desconocida se insertan en la fórmula para obtener la concentración precisa de analito hapténico hidrófobo en la muestra desconocida. Por ejemplo, para un ensayo particular para un analito hapténico hidrófobo particular, se determinó que la fórmula de corrección predeterminada era  $[An] = [Anm] + (0,22 \times [SIm] + (-28))$ ; por tanto, si el valor de  $[Anm]$  es de 36 ng/ml y el valor de  $[SIm]$  es 130 ng/ml, la ecuación se convierte en  $[An] = 36 + (0,22 \times 130 + (-28))$  o  $[An] = 36 + 28,6 - 28 = 36,6$  ng/ml.

#### Kits para realizar ensayos

Los reactivos para realizar un ensayo particular pueden estar presentes en un kit útil para realizar convenientemente un ensayo para la determinación de un analito hapténico hidrófobo. En un ejemplo, un kit comprende en una combinación envasada reactivos para analizar un analito, cuya naturaleza depende del formato de ensayo particular. Los reactivos pueden incluir, por ejemplo, un compañero de unión para el analito. 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 envasados por separado para realizar un ensayo, tales como miembros de unión adicionales y reactivos complementarios.

Las cantidades relativas de los diversos reactivos en los kits pueden variarse ampliamente para proporcionar concentraciones de los reactivos que sustancialmente optimicen las reacciones que deben producirse durante el presente método y adicionalmente para optimizar sustancialmente la sensibilidad del 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 los excipientes, que en disolución proporcionarán una solución de reactivo que tenga las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo. El kit puede incluir adicionalmente una descripción escrita de un método o ensayo, así como una fórmula de corrección de acuerdo con las presentes realizaciones como se ha descrito anteriormente.

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

La designación "primero" y "segundo" es completamente arbitraria y no pretende sugerir ningún orden o clasificación entre los elementos identificados ni ningún orden de adición de los artículos. Los ejemplos del uso de primer y segundo en el presente documento incluyen, por ejemplo, primer método de ensayo y segundo método de ensayo, y primer miembro del sps y segundo miembro del sps.

Los siguientes ejemplos describen adicionalmente las realizaciones específicas de la invención a modo de ilustración y no de limitación y tienen por objeto describir y no limitar el alcance de la invención. Las partes y porcentajes desvelados en el presente documento están en volumen, a menos que se indique lo contrario.

#### **Ejemplos**

##### Determinación de la fórmula de corrección

Se empleó un conjunto de 11 muestras de suero diferentes en el que cada miembro del conjunto de muestras se obtuvo de diferentes individuos. Se analizó una porción de cada muestra para determinar la concentración de 25(OH) vitamina D usando un inmunoensayo de Siemens Healthcare Diagnostics Inc. (Newark DE). El inmunoensayo se realizó en el sistema de química clínica DIMENSION® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.). El ensayo DIMENSION® EXL® 25(OH) Vitamin D Total (VitD) es un inmunoensayo quimioluminiscente competitivo homogéneo basado en la tecnología de inmunoensayo de canalización de oxígeno luminiscente (LOCI, por sus siglas en inglés). Mide la concentración total de 25(OH) vitamina D (25(OH)D<sub>2</sub> y 25(OH)D<sub>3</sub>) tanto en suero como en plasma. Los componentes del VitD de LOCI incluyen un reactivo de liberación, dos reactivos de perlas sintéticas y un anticuerpo monoclonal biotinilado. El primer reactivo de perlas (Sensibeads) se recubrió con estreptavidina y contenía un tinte fotosensible y se preparó 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 fue bis-(trihehil)-silicio-t-butil-ftalocianina. El segundo reactivo en perlas (Chemibeads) se recubrió con un análogo de 25(OH) vitamina D<sub>3</sub> y contenía un colorante quimioluminiscente y se preparó mediante un procedimiento similar al descrito en la Patente de los EE.UU. N.º 7.179.660. El compuesto quimioluminiscente fue 2-(4-(N,N-di-tetradecil)-anilino-3-fenil tioeno con quelato de europio. La muestra se incubó con un reactivo de liberación (ácidos anilinaftaleno sulfónicos (ANS)) para liberar las moléculas de vitamina D de sus proteínas de unión. La mezcla de reacción se incubó después con un anticuerpo biotinilado para formar un complejo de 25(OH) vitamina D/anticuerpo biotinilado. Se añadieron Chemibeads para retirar el exceso de anticuerpo biotinilado libre y después se añadieron Sensibeads para desencadenar la formación de los complejos Chemibead-

análogo/anticuerpo-biotina/estreptavidina-Sensibeads. La iluminación de la mezcla de reacción a 680 nm generó oxígeno singlete a partir de las Sensibeads, que se difundió en las Chemibeads y desencadenó una reacción quimioluminiscente. La señal resultante se midió a 612 nm y fue inversamente proporcional a la concentración de 25(OH) vitamina D total en la muestra.

- 5 Otra porción de cada muestra se analizó para determinar la concentración de vitamina D usando DI-CL/EM/EM (dilución de isótopos-cromatografía/espectrometría de masas/espectrometría de masas) como método de referencia.

10 Otra porción de cada muestra se analizó para determinar la concentración de colesterol por medio de un ensayo de concentración de colesterol total (N.º DF27) de Siemens Healthcare Diagnostics Inc. de acuerdo con el protocolo del fabricante. En el ensayo, el colesterol esterasa (CE) cataliza la hidrólisis de ésteres de colesterol para producir colesterol libre que, junto con el colesterol libre preexistente, se oxida en una reacción catalizada por el colesterol oxidasa (CO) para formar colest-4-eno-3-ona y peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa de rábano picante (POR), el peróxido de hidrógeno formado de este modo se usa para oxidar N,N-dietilnilina-HCl/4-aminoantipirina (DEA-HCl/AAP) para producir un cromóforo que absorbe a 540 nm. La absorbancia debida a DEA-HCl/AAP oxidada es directamente proporcional a la concentración de colesterol total y se mide usando una técnica de punto final policromática (452 nm, 540 nm, 700 nm) (nm es nanómetros).

15 La concentración de vitamina D obtenida para cada muestra diferente usando el método de inmunoensayo se restó de la concentración de vitamina D obtenida para cada muestra diferente usando el método de referencia para obtener un sesgo para cada muestra diferente. El sesgo para cada muestra diferente se representó en función de la concentración de colesterol para cada muestra diferente. Los resultados se representan en la Fig. 1 donde [vitD] es la concentración de vitamina D, CLEM es la concentración de vitamina D medida usando el método de referencia, DM EXL es la concentración de vitamina D medida usando el inmunoensayo, mg es miligramo, dl es decilitro, y es la variable de criterio, x es la variable predictiva y R<sup>2</sup> es el cuadrado del coeficiente de correlación.

20 A partir de los resultados anteriores, se desarrolló la siguiente fórmula de corrección:  $[An] = [Anm] + (a \times [SIm] + b)$  en la que [An] es la concentración real de la vitamina D en una muestra desconocida, [Anm] es la concentración medida de vitamina D en una muestra desconocida, [SIm] es la concentración medida de colesterol en la muestra desconocida, a es la pendiente de la línea de regresión, que en este ejemplo es 0,2213 y b es la intersección de la línea de regresión, que en este ejemplo es -27,966. La fórmula de corrección es, por tanto,

$$[\text{vitamina D real}] = [\text{vitamina D medida}] + (0,2213 \times [\text{colesterol}] - 27,966).$$

#### Verificación de la fórmula de corrección

30 La verificación de la fórmula de corrección determinada anteriormente se realizó calculando un sesgo con una concentración real de vitamina D usando la concentración medida de vitamina D y la fórmula de corrección anterior. El sesgo se representó en función de la concentración de colesterol para cada una de las diferentes muestras. Los resultados se muestran en la Fig. 2 donde 3E-5 es  $3 \times 10^{-5}$ . Como puede observarse, ya no existe una correlación entre el sesgo y la concentración de colesterol después de la aplicación de la fórmula de corrección para determinar una concentración real de vitamina D en las muestras.

35 Como puede observarse con referencia a las Fig. 3 y 4, después de la aplicación de la fórmula de corrección, el coeficiente de correlación (dispersión de los datos en la correlación entre la concentración de vitamina D determinada usando el inmunoensayo y la concentración de vitamina D determinada usando el método DI-CLEM/EM) mejoró. En las Fig. 3 y 4, R es el coeficiente de correlación, ng es nanogramo o nanogramos y ml es mililitro o mililitros.

40 Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, será evidente para los expertos en la materia a la luz del contenido de la presente invención que pueden hacerse a la misma ciertos cambios y modificaciones. Además, la descripción anterior, con fines de explicación, utilizó una nomenclatura específica para proporcionar una comprensión completa de la invención. Sin embargo, será evidente para un experto en la materia que los detalles específicos no son necesarios con el fin de poner en práctica la invención. Por tanto, las descripciones anteriores de realizaciones específicas de la presente invención se presentan con fines de ilustración y descripción; no tienen por objeto ser exhaustivos ni limitar la invención a las formas precisas desveladas. Son posibles muchas modificaciones y variaciones en vista del contenido anterior. Las realizaciones se eligieron y describieron con el fin de explicar los principios de la invención y sus aplicaciones prácticas y, de este modo, permitir que otros expertos en la materia utilicen la invención.

## REIVINDICACIONES

1. Un método de determinación de una concentración real de un analito hapténico hidrófobo en una muestra desconocida que se sospecha que contiene el analito hapténico hidrófobo, en el que se sospecha que la muestra desconocida contiene una sustancia interferente, comprendiendo el método:

- 5 (a) realizar un primer método de ensayo en una muestra desconocida para obtener una concentración medida del analito hidrófobo hapténico en la muestra desconocida y realizar un segundo método de ensayo en la muestra desconocida para obtener una concentración de la sustancia interferente en la muestra desconocida; y  
 10 (b) aplicar una fórmula de corrección predeterminada que utilice la concentración medida del analito hapténico hidrófobo y la concentración medida de la sustancia interferente obtenida en la etapa (a) para determinar una concentración real del analito hapténico hidrófobo en la muestra desconocida, en la que la fórmula de corrección se predetermina mediante un método que comprende:

- 15 (i) medir una concentración del analito hapténico hidrófobo para al menos dos muestras diferentes usando el primer método de ensayo y medir la concentración del analito hapténico hidrófobo para las al menos dos muestras diferentes usando un método de referencia en el que las muestras también comprenden la sustancia interferente,  
 (ii) determinar un sesgo entre el primer método de ensayo y el método de referencia en el que el sesgo es la diferencia entre la concentración del analito hapténico hidrófobo determinada mediante el método de referencia y el primer método de ensayo para cada muestra diferente;  
 20 (iii) medir una concentración de la sustancia interferente para al menos dos muestras diferentes; y  
 (iv) determinar la fórmula de corrección realizando un análisis de regresión usando el sesgo y la concentración de la sustancia interferente para cada una de las al menos dos muestras diferentes,

en el que el análisis de regresión comprende formar una línea de regresión y usar la pendiente y la intersección de la línea de regresión para formar la siguiente fórmula de corrección:

$$[An] = [Anm] + (a \times [SIm] + b)$$

25 en la que:

- [An] es la concentración real del analito hidrófobo hapténico en la muestra desconocida,  
 [Anm] es la concentración medida del analito hapténico hidrófobo en la muestra desconocida,  
 [SIm] es la concentración medida de la sustancia interferente en la muestra desconocida,  
 a es la pendiente de la línea de regresión, y  
 30 b es la intersección de la línea de regresión.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el primer método de ensayo comprende:

- (i) añadir reactivos para determinar la concentración medida del analito hapténico hidrófobo en la muestra a un medio que comprende la muestra en el que los reactivos comprenden al menos un compañero de unión para el analito hapténico hidrófobo, e  
 35 (ii) incubar el medio en condiciones para la unión del analito hapténico hidrófobo al compañero de unión para el analito hapténico hidrófobo.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el analito hapténico hidrófobo se selecciona entre el grupo que consiste en vitaminas liposolubles, hormonas esteroideas, fármacos terapéuticos y drogas de abuso.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el analito hapténico hidrófobo es la vitamina D.

40 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el primer método de ensayo comprende:

- combinar en un medio de ensayo la muestra con (i) un anticuerpo para el analito hapténico hidrófobo capaz de unirse al analito hapténico hidrófobo para formar complejos y (ii) un miembro de un sistema productor de señales que produce una señal en relación con la cantidad de complejos de analito hapténico hidrófobo en el que el miembro del sistema productor de señales está unido al anticuerpo o a un análogo de analito hapténico hidrófobo que compite con el analito hapténico hidrófobo en la muestra por la unión al anticuerpo,  
 45 incubar el medio de ensayo en condiciones para formar los complejos,  
 determinar una cantidad de señal a partir de los complejos y  
 relacionar la cantidad de señal con la concentración medida de analito hapténico hidrófobo en la muestra.

6. Un método de determinación de una concentración real de un analito de vitamina D en una muestra desconocida que se sospecha que contiene el analito de vitamina D, en el que se sospecha que la muestra desconocida contiene colesterol, comprendiendo el método:

(a) realizar un primer método de análisis en una muestra desconocida para obtener una concentración medida del analito de vitamina D en la muestra desconocida y realizar un segundo método de ensayo en la muestra desconocida para obtener una concentración de colesterol; y  
(b) aplicar una fórmula de corrección predeterminada que utiliza la concentración medida del analito de vitamina D y la concentración medida de colesterol obtenida en la etapa (a) para determinar una concentración real del analito de vitamina D en la muestra desconocida, en la que la fórmula de corrección se predetermina mediante un método que comprende:

(i) medir una concentración del analito de vitamina D para al menos dos muestras diferentes usando el primer método de ensayo y medir la concentración del analito de vitamina D para las al menos dos muestras diferentes usando un método de referencia en el que las al menos dos muestras diferentes comprenden adicionalmente colesterol,

(ii) determinar un sesgo entre el primer método de ensayo y el método de referencia en el que el sesgo es la diferencia entre la concentración del analito de vitamina D determinada mediante el método de referencia y el primer método de ensayo para cada muestra diferente;

(iii) medir una concentración de colesterol para cada una de las al menos dos muestras diferentes; y

(iv) determinar la fórmula de corrección realizando un análisis de regresión usando el sesgo y la concentración de colesterol para cada una de las al menos dos muestras diferentes,

en el que el análisis de regresión comprende formar una línea de regresión y usar la pendiente y la intersección de la línea de regresión para formar la siguiente fórmula de corrección:

$$[\text{vitamina D}] = [\text{vitamina D m}] + (a \times [\text{colesterol m}] + b)$$

en la que:

[vitamina D] es la concentración real del analito de vitamina D en la muestra desconocida,  
[vitamina D m] es la concentración medida del analito de vitamina D en la muestra desconocida,  
[colesterol m] es la concentración medida de colesterol en la muestra desconocida,  
a es la pendiente de la línea de regresión, y  
b es la intersección de la línea de regresión.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6 en el que el primer método de ensayo comprende:

(i) añadir reactivos para determinar la concentración medida del analito de vitamina D en la muestra a un medio que comprende la muestra en el que los reactivos comprenden al menos un compañero de unión para el analito de vitamina D, e

(ii) incubar el medio en condiciones para la unión del analito de vitamina D al compañero de unión para el analito de vitamina D.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 6 en el que el primer método de ensayo es un inmunoensayo.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 6 en el que la muestra es una excreción corporal, un producto de aspiración corporal, un producto de excisión corporal o un producto de extracción corporal.

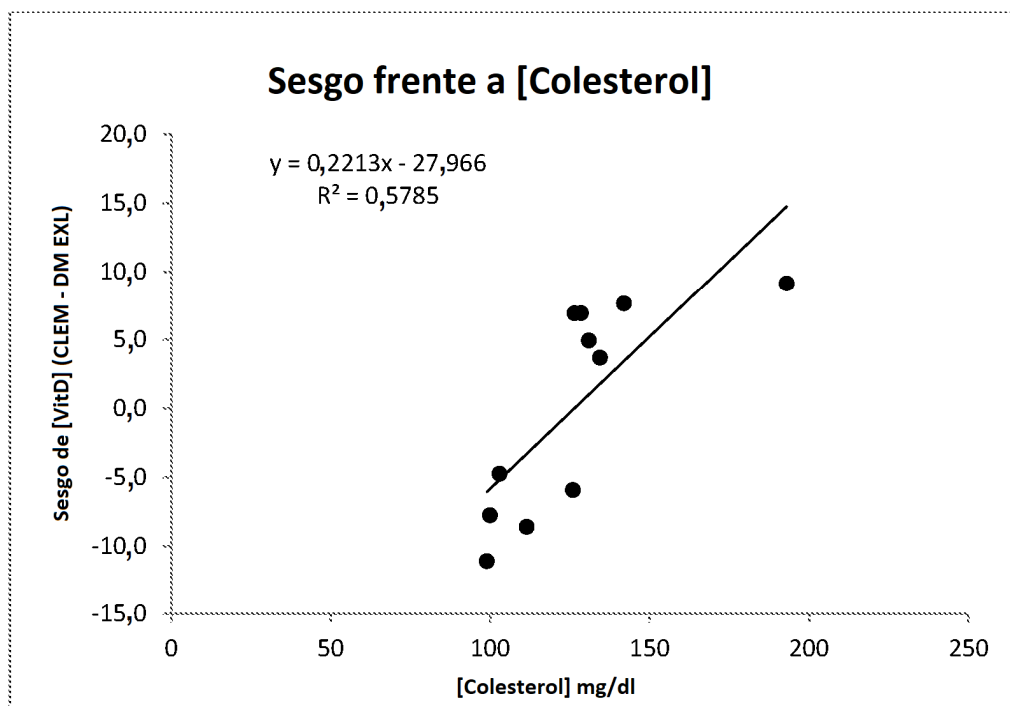
10. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 6 en el que el método de referencia se selecciona entre el grupo que consiste en espectrometría de masas, cromatografía líquida, electroforesis, microfluidos, microscopía, espectroscopía, ensayos químicos e inmunoensayos, y una combinación de dos o más de los mismos.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 6 en el que el análisis de regresión comprende formar una línea de regresión y desarrollar la fórmula de corrección a partir de la línea de regresión.

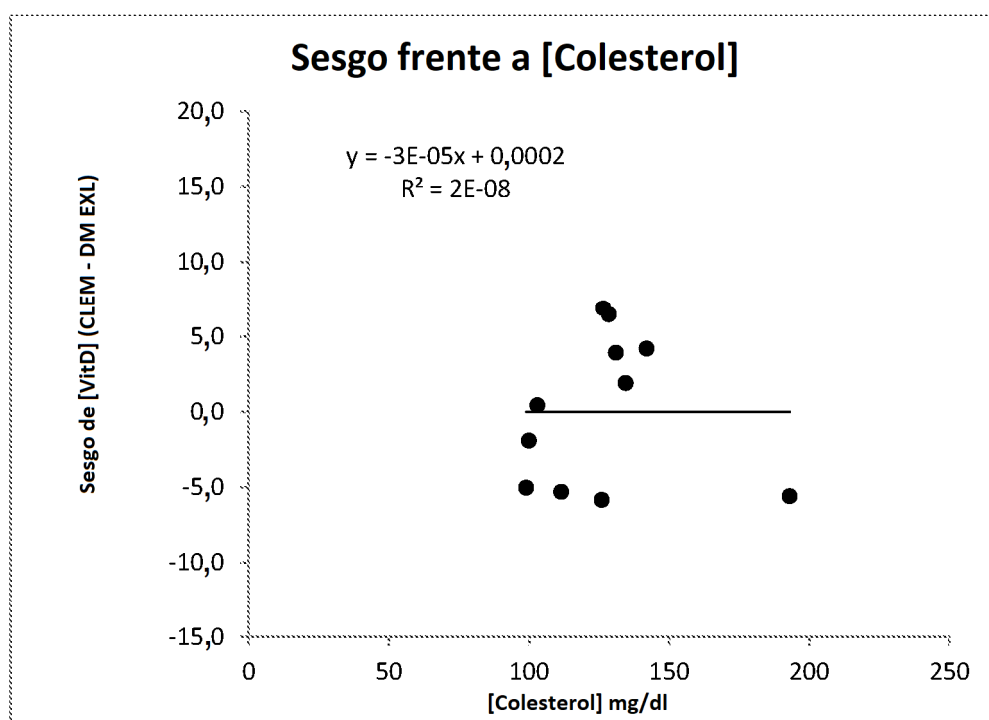
12. El método de acuerdo con la reivindicación 6 en el que el primer método de ensayo comprende:

combinar en un medio de ensayo la muestra con (i) un anticuerpo para el analito de vitamina D capaz de unirse al analito de vitamina D para formar complejos y (ii) un miembro de un sistema productor de señales que produce una señal en relación con la cantidad de complejos de analito de vitamina D en el que el miembro del sistema productor de señales está unido al anticuerpo o a un análogo de analito de vitamina D que compite con el analito de vitamina D en la muestra por la unión al anticuerpo,

incubar el medio de ensayo en condiciones para formar los complejos,  
determinar una cantidad de señal a partir de los complejos y  
relacionar la cantidad de señal con la concentración medida de analito de vitamina D en la muestra.

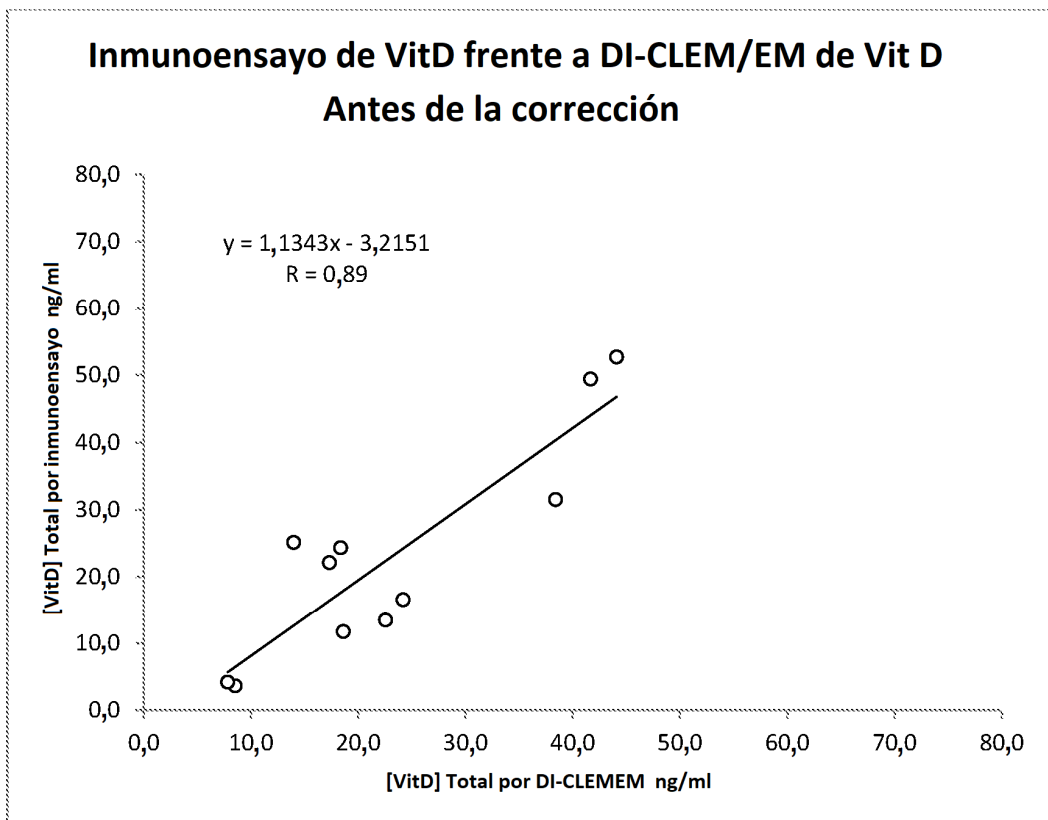


**FIG. 1**

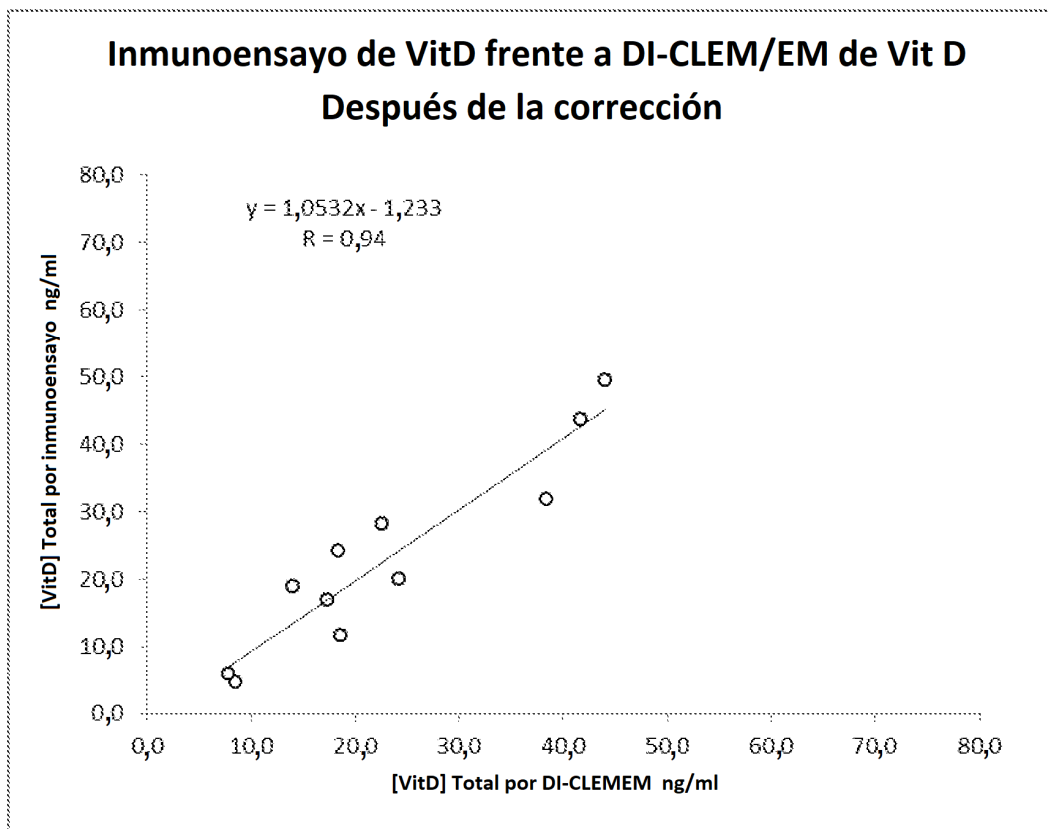


**FIG. 2**





**FIG. 3**



**FIG. 4**