

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 811**

51 Int. Cl.:

G01N 33/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2011** E 11714128 (3)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019** EP 2553467

54 Título: **Inmunoensayo para vitamina D libre**

30 Prioridad:

01.04.2010 EP 10159035

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

05.04.2019

73 Titular/es:

**FUTURE DIAGNOSTICS B.V. (100.0%)
Nieuweweg 279
6603 BN Wijchen, NL**

72 Inventor/es:

**MARTENS, MICHAËL FRANCISCUS WILHELMUS
CORNELIS;
PARSONS, GEORGE HENRY;
ROSMALLEN, FRANCISCUS MARIA ANNA y
SWINKELS, LEON MARIA JACOBUS WILHELMUS**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 707 811 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

Inmunoensayo para vitamina D libre

Campo de la invención

5 La invención se refiere a un método de inmunoensayo para analizar una muestra de sangre o componentes sanguíneos en busca de vitamina D libre. La invención también se refiere a inmunoensayos y kits para realizar tales inmunoensayos que incluyen pruebas en el punto de atención.
Antecedentes de la invención

10 Las sustancias denominadas como "vitamina D" abarcan un grupo de prohormonas solubles en grasa, así como sus metabolitos y análogos. Las principales formas en que se encuentra la vitamina D en el cuerpo son la vitamina D₂ (ergocalciferol) y la vitamina D₃ (colecalfiferol). Esta última es la forma endógena de la vitamina D, que los humanos pueden formar en la piel bajo la influencia de la luz solar. La primera es una forma exógena de vitamina D, consumida con los alimentos. En los Estados Unidos, la vitamina D₂ se utiliza como suplemento farmacéutico de vitamina D. A menos que se indique lo contrario, el término vitamina D en esta divulgación se refiere a cualquier forma o formas de la vitamina D, incluidos los metabolitos de la vitamina D, tales como la 25-hidroxi-vitamina D o la 1,25 dihidroxi vitamina D.

15 Aunque la vitamina D₂ y la D₃ difieren en la estructura molecular de sus cadenas laterales, comparten la misma actividad biológica al ser prohormonas, metabolizadas en dos etapas, finalmente, hasta 1,25 dihidroxi vitamina D (1,25-(OH)₂-vitamina D) también conocida como calcitriol, o 1,25 dihidroxi colecalfiferol). El metabolito anterior, 25-hidroxi vitamina D (25-(OH)-vitamina D) o calcidiol, resulta de la conversión en el hígado y se considera la forma de almacenamiento de vitamina D en el cuerpo.

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

25 La vitamina D ha sido reconocida por mucho tiempo como una sustancia importante, cuya forma activa desempeña un papel en la formación y el mantenimiento de los huesos, así como en otros procesos en el cuerpo humano o animal. Por lo tanto, sirve para aumentar el flujo de calcio en el torrente sanguíneo, promoviendo la absorción de calcio y fósforo de los alimentos en los intestinos y la reabsorción de calcio en los riñones; lo que permite la mineralización normal del hueso y previene la tetania hipocalcémica. También es necesaria para el crecimiento óseo y la remodelación ósea por osteoblastos y osteoclastos.

30 La deficiencia de vitamina D da como resultado una mineralización ósea alterada y conduce a enfermedades de ablandamiento óseo, raquitismo en niños y osteomalacia en adultos, y posiblemente contribuye a la osteoporosis.

35 La vitamina D desempeña una serie de otras funciones en la salud humana, incluida la inhibición de la liberación de calcitonina de la glándula tiroides. La calcitonina actúa directamente sobre los osteoclastos, lo que resulta en la inhibición de la resorción ósea y la degradación del cartílago. La vitamina D también puede inhibir la secreción de hormona paratiroidea de la glándula paratiroidea, modular la función neuromuscular e inmune y reducir la inflamación. Por lo tanto, es esencial para la salud de una persona o animal tener un nivel adecuado de vitamina D.

40 Sin embargo, el exceso de vitamina D (que puede ocurrir como resultado de una sobredosis) es tóxico. Algunos síntomas de la toxicidad de la vitamina D son la hipercalcemia (un nivel elevado de calcio en la sangre) causado por el aumento de la absorción intestinal de calcio. Se sabe que la toxicidad de la vitamina D es una causa de la presión arterial alta. Los síntomas gastrointestinales de la toxicidad de la vitamina D pueden incluir anorexia, náuseas y vómitos. Estos síntomas suelen ir seguidos de poliuria (producción excesiva de orina), polidipsia (aumento de la sed), debilidad, nerviosismo, prurito (picazón) y, finalmente, insuficiencia renal.

45 Claramente, es importante poder diagnosticar a los sujetos por una posible deficiencia de vitamina D. También es importante, especialmente para los sujetos que reciben suplementos de vitamina D, poder examinarlos en busca de un exceso potencial de vitamina D. El nivel en suero total de 25-(OH)-vitamina D se considera el principal indicador del estado de la vitamina D (2). Sin embargo, esta noción ha sido cuestionada.

50 Casi toda la 25-(OH)-vitamina D circulante en suero está unida a la proteína de unión a la vitamina D (88%) y la albúmina (12%). La proteína de unión a la vitamina D (DBP) es un componente importante del suero, con una concentración de 250-400 mg/L de suero. Solo una pequeña porción, aproximadamente el 2%, de los sitios de unión a la vitamina D de la DBP está ocupada. Una fracción muy pequeña, 0,04% de la 25-(OH)-vitamina D, circula en forma libre, no unida a proteínas.

55 La concentración de DBP no es constante en todas las personas y puede verse influida por otros factores que incluyen el embarazo, el uso de anticonceptivos orales, enfermedad renal y enfermedad hepática. El conocimiento de la concentración de la DBP es crucial para una evaluación precisa del estado real de 25-(OH)-vitamina D del paciente.

Por ejemplo, una mujer joven que toma anticonceptivos orales podría tener un nivel total de 25-(OH)-vitamina D en el intervalo normal. Sin embargo, debido a su DBP elevada, la concentración de 25-(OH)-vitamina D libre podría estar marcadamente deprimida, lo que aumenta el riesgo de insuficiencia clínica de 25-(OH)-vitamina D y todos los riesgos que conlleva esa afección.

- 5 Se ha demostrado que la actividad fisiológica de las hormonas tiroidea y esteroide *in vivo* se correlaciona mejor con su fracción libre, no unida a proteínas, que con la concentración total de la hormona en el plasma. Especialmente en situaciones en las que el nivel de proteínas de unión se eleva o disminuye, la medición de la hormona circulante total puede llevar a un diagnóstico erróneo. En tales situaciones, la medición de la concentración de la hormona circulante libre proporciona una mejor información. Esta noción se conoce como la "hipótesis de la hormona libre". Mendel (3)
- 10 sugirió que la hipótesis de la hormona libre "es probable que sea válida con respecto a todos los tejidos para las hormonas tiroideas, para el cortisol y también para los metabolitos hidroxilados de la vitamina D.

Bikle et al. (4) probó la validez de la hipótesis de la hormona libre para 1,25-(OH)₂-vitamina D. Los datos sugirieron que los niveles de 1,25-(OH)₂-vitamina D libre parecían estar bien mantenidos incluso en sujetos con enfermedad hepática y niveles reducidos de DBP, a pesar de una disminución significativa del total de 1,25-(OH)₂-vitamina D.

- 15 En un estudio posterior sobre la 25-(OH)-vitamina D, el mismo grupo recomendó medir la 25-(OH)-vitamina D libre en situaciones con concentraciones modificadas de la proteína de unión. El autor concluyó que las mediciones del metabolito de la vitamina D total pueden ser engañosas en la evaluación del estado de la vitamina D en pacientes con enfermedad hepática, y recomienda que también se determinen los niveles de 25-(OH)-vitamina D libre antes de hacer un diagnóstico de deficiencia de vitamina D. Bikle et al. utilizó la ultrafiltración para determinar el nivel de 25-(OH)-
- 20 vitamina D libre (5). Este método requiere una vitamina D radiomarcada altamente purificada y tiende a sobreestimar la fracción de vitamina D libre.

Lauridsen et al. (6) mostraron que las mujeres con diferentes fenotipos de DBP tienen diferentes concentraciones de 1,25(OH)₂VitD y 25(OH)VitD. Estos autores sugieren que las mujeres con Gc2-2 tienen suficiente vitamina D a niveles en plasma más bajos de 25(OH)VitD.

- 25 Se puede hacer referencia a alguna técnica anterior con respecto a la determinación de analitos libres.

La patente estadounidense No. 4.366.143 describe una invención relacionada con el ensayo de la porción libre de sustancias orgánicas o ligandos que están presentes en fluidos biológicos en una forma unida y libre. El método es esencialmente un inmunoensayo competitivo en el que, en una etapa, un ligando marcado y un aglutinante específico se agregan a una muestra simultáneamente. La porción libre del ligando y el ligando marcado compiten por la reacción

30 con el aglutinante específico, y se unen al mismo en proporciones que dependen de la cantidad de la porción de ligando libre presente en la muestra. Un inconveniente del método descrito es que, debido a la presencia tanto del aglutinante específico como del ligando marcado, existe una pluralidad de factores que pueden alterar el equilibrio entre el ligando unido y el ligando libre, lo que hace que el método sea menos adecuado para su uso con un ligando libre que está presente en una cantidad relativamente baja como es el caso con la vitamina D. De hecho, no se describe cómo usar el ensayo para la medición de la vitamina D libre.

35

La patente de Estados Unidos No. 4.292.296 describe un método para la determinación de analitos libres en muestras que contienen analitos libres y analitos unidos a receptores. El método implica dos etapas, la primera es poner en contacto una muestra con un absorbente para que el analito elimine el analito de la solución. La segunda etapa comprende poner en contacto el analito unido a un absorbente con un análogo de analito marcado. A continuación, la fase soluble se elimina del absorbente, y se determina la cantidad de marcador en las fases unida y lavada. El método se describe para determinar la concentración de hormonas tiroideas libres.

40

La solicitud de patente de Estados Unidos No. 2008/0182341 se relaciona con agentes estabilizantes que son útiles para la medición de concentraciones de analito libre o no unido en un fluido. Se sugiere que los estabilizadores evitan la disociación del ligando de su proteína de unión. La referencia emplea un procedimiento de ensayo simultáneo, y enumera una variedad de agentes estabilizantes. Se establece que el agente estabilizante no comprende un tensoactivo alquilamina fluorado.

45

El documento WO 03/023391 se refiere a un método y un regulador de muestra para un ensayo de medición directa con el fin de determinar los compuestos de vitamina D en plasma o suero. El ensayo aquí descrito se basa en un análisis de unión a proteínas en anticuerpos en lugar de la proteína de unión a vitamina D en relación con el compuesto de vitamina D que se va a determinar, y la muestra y el regulador de análisis contienen al menos un 0,05% en peso de ácido carboxílico aromático hidroxilado soluble.

50

El documento WO 2008/039266 se relaciona con composiciones útiles para la medición de concentraciones de analitos libres o no unidos en un fluido. Revela el uso de ligandos de captura y agentes estabilizantes para mejorar la precisión de los ensayos de concentración de los analitos.

- 55 El documento WO 2008/092917 está dirigido a un método para cuantificar metabolitos de vitamina D directamente en plasma o suero sanguíneo. El método descrito en este documento comprende una digestión de las proteínas del suero con una serina proteasa y una secuencia de etapas para inhibir la actividad de la proteasa durante el análisis de unión

competitiva.

La patente de Estados Unidos No. 5.981.779 se refiere a compuestos no radiactivos de vitamina D y a métodos para analizar la presencia de vitamina D, análogos de vitamina D y sus metabolitos. Los métodos de ensayo descritos aquí pueden ser inmunoensayos ligados a enzimas, ensayos fluorimétricos y ensayos quimioluminométricos.

- 5 B.W. Hollis et al., *Clinical Chemistry*, 1993, vol. 39, no. 3, páginas 529-533 describen un radioinmunoensayo para un metabolito de la vitamina D que utiliza un trazador radioyodado.

10 El documento WO 2012/091569 se refiere a un inmunoensayo de 25(OH)vitamina D en sangre o componentes sanguíneos. En este caso, se emplea un ácido perfluoroalquilo, o una sal del mismo, para liberar 25(OH)vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D, después de lo cual la 25-OH vitamina D se somete a un ensayo de unión competitiva con un compuesto de vitamina D marcado.

Ninguna de las referencias de la técnica anterior proporciona específicamente un ensayo para una determinación de la vitamina D que refleje el estado de la vitamina D libre.

15 Se observa que los ensayos para la vitamina D libre se conocen desde hace décadas, pero estos utilizan métodos basados en la diálisis de equilibrio o la diálisis de velocidad. Tales métodos son aceptables para investigadores con personal técnico altamente capacitado, pero no son adecuados para laboratorios de rutina que necesitan pruebas automatizadas de alto rendimiento para alcanzar sus objetivos financieros. Por lo tanto, se desea proporcionar un ensayo para la vitamina D libre que pueda automatizarse y que sea adecuada para su uso en pruebas en el punto de atención.

Las referencias numeradas anteriores son:

- 20 1. Hollis BW. Measuring 25-hydroxyvitamin D in a clinical environment: challenges and needs. *Am J Clin Nutr.* Agosto de 2008; 88 (2): 507S-510S.
2. Holick MF. Vitamin D: extraskeletal health. *Endocrinol Metab Clin North Am.* Junio de 2010; 39 (2): 381-400.
- 25 3 Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev.* Agosto de 1989; 10 (3): 232-74.
4. Bikle D, Gee E, Halloran B, Haddad J. Free 1,25-Dihydroxyvitamin D Levels in Serum from Normal Subjects, Pregnant Subjects, and Subjects with Liver Disease. *J Clin Invest.* 1984; 74: 1966-1971.
- 30 5. Bikle D, Gee E, Halloran B, Kowalski MA, Ryzen E, Haddad J. Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab.* Octubre de 1986; 63 (4): 954-9.
6. Lauridsen AL, Vestergaard P, Hermann AP, Brot C, Heickendorff L, Mosekilde L, Nexø E. Plasma concentrations of 25-hydroxy-vitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D are related to the phenotype of Gc (vitamin D-binding protein): a cross-sectional study on 595 early postmenopausal women. *Calcif Tissue Int.* Julio de 2005; 77 (1): 15-22.
- 35 7. van Hoof HJ, Swinkels LM, Ross HA, Sweep CG, Benraad TJ. Determination of non-protein-bound plasma 1,25-dihydroxyvitamin D by symmetric (rate) dialysis. *Anal Biochem.* Mayo 1 de 1998; 258 (2): 176-83.

Sumario de la invención

Con el fin de abordar mejor uno o más de los deseos anteriores, la invención, en un aspecto, presenta un método para analizar una muestra de sangre o componentes de la sangre para determinar la presencia de vitamina D libre, incluidos los metabolitos de la vitamina D, tales como 25-hidroxi-vitamina D o 1,25 dihidroxi vitamina D, que comprende

- 40 (a) agregar una proteína o anticuerpo de unión inmovilizado para 25-OH vitamina D a la muestra;
- (b) mezclar la muestra con un diluyente, comprendiendo dicho diluyente un tensioactivo fluoroalquilo;
- (c) incubar la muestra durante una cantidad efectiva de tiempo para permitir que una cantidad deseada de vitamina D se una a la proteína o al anticuerpo de unión;
- (d) eliminar el suero no unido y los componentes del suero mediante lavado;
- 45 (e) someter la proteína o anticuerpo de unión inmovilizado que comprende la vitamina D capturada unida al mismo, a la unión competitiva con un compuesto de vitamina D marcado;
- (f) determinar la concentración del compuesto de vitamina D marcado unido a la proteína o el anticuerpo de unión, en

donde la concentración se determina con referencia a una concentración del calibrador para 25-OH vitamina D libre, en donde el tensioactivo fluoroalquilo es ácido perfluorooctanoico y en donde la concentración de el tensioactivo es de 0,1-0,25% en peso. En otro aspecto, la invención reside en un kit para llevar a cabo el método anterior.

- 5 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para analizar una muestra de sangre o componentes sanguíneos para determinar la presencia de vitamina D libre, que comprende en una primera etapa la captura de vitamina D en un aglutinante inmovilizado tal como una proteína de unión inmovilizada o anticuerpo para 25-OH vitamina D, y en una etapa posterior, la 25-OH vitamina D capturada se somete a un ensayo de unión competitiva contra una variante de vitamina D marcada, en donde la captura de vitamina D libre se efectúa mediante el secuestro de una cantidad de vitamina D unida, en donde la fracción de vitamina D secuestrada es 0,1-10% en peso de la vitamina D total presente en la muestra, y preferiblemente no excede el 5% en peso de la misma para satisfacer una prueba de repetición, en donde la muestra a partir de la cual se capturó la vitamina D se somete a las mismas etapas de captura de vitamina D y se somete a la vitamina D capturada al mismo ensayo de unión competitiva, y en donde la concentración medida de vitamina D libre después de ambos ensayos de unión competitiva es sustancialmente la misma.
- 10
- 15 El método de la invención se puede usar para las pruebas en el punto de atención. Este último se refiere a las pruebas en o cerca del sitio de atención al paciente, es decir, en lugar de extraer muestras de sangre y enviarlas a un laboratorio de diagnóstico, se puede introducir inmediatamente una muestra en un dispositivo portátil, preferiblemente de mano, que sea capaz de realizar el ensayo en el menor número de etapas posible, y con el menor número posible de operaciones manuales.
- 20 En la realización de la invención, se hace uso de un agente tensioactivo fluoroalquilo, en el que el agente tensioactivo fluoroalquilo es ácido perfluorooctanoico (PFOA), como un potenciador de la solubilidad de la vitamina D en un inmunoensayo para la determinación de la vitamina D libre.

Descripción de la figura

- 25 La Figura 1 representa una correlación entre la concentración de vitamina D libre en la primera y la segunda pasada de un ensayo de la invención. La línea que se muestra es el resultado de una inmunoextracción repetida usando 10 muestras con diferentes niveles de vitamina D libre. La pendiente de la línea de regresión no es significativamente diferente de la unidad.

Descripción detallada de la invención

- 30 En un sentido amplio, la invención se refiere a un ensayo de dos etapas para la determinación de la vitamina D libre, que comprende la inmunoadsorción de 25(OH)-vitamina D no unida a proteínas de la sangre o componentes de la sangre, especialmente suero o plasma, después de lo cual se mide la vitamina D absorbida.

Dichas muestras pueden extraerse, de cualquier manera conocida en la técnica, de un sujeto, particularmente un ser humano, en cuya sangre se desea analizar la presencia de 25-OH-vitamina D libre.

- 35 La vitamina D libre se refiere a la fracción circulante y no unida de la vitamina D. Esto se relaciona con cualquier forma de vitamina D, incluida la vitamina D₂, la vitamina D₃ y los metabolitos 25(OH)-vitamina D₂, 25-(OH)-vitamina D₃, 1,25(OH)₂-vitamina D₂ y 1,25(OH)₂-vitamina D₃. El ensayo se puede usar para medir cualquiera de estas formas de vitamina D libre, sola o en combinación. Preferiblemente, el ensayo de la invención se usa para medir 25(OH)-vitamina D libre, dando como resultado la determinación de 25(OH)-vitamina D₂ y 25-(OH)-vitamina D₃. Los términos "libre" y "no unida" se refieren a la fracción no unida a ninguna proteína, que incluye principalmente la proteína de unión a la vitamina D (VDBP o DBP).
- 40

- 45 La muestra se diluye preferiblemente antes, durante o después de la adición de la proteína de unión. El diluyente de la muestra puede ser de base acuosa y, preferiblemente, será una solución reguladora. Preferiblemente, el pH regulado está en el intervalo de 6,0 a 8,0. El regulador incluye un tensioactivo fluoroalquilo, que es ácido perfluorooctanoico. Se entenderá que la mezcla del regulador con la muestra se puede hacer agregando el diluyente a la muestra, agregando la muestra al diluyente, o agregando simultáneamente el regulador y la muestra. Por razones prácticas, se prefiere agregar el diluyente a la muestra.

Sin querer limitarse a ninguna teoría, los inventores creen que el tensioactivo aumenta la solubilidad de la vitamina D de tal manera que da como resultado un secuestro limitado de la vitamina D.

- 50 En otro aspecto, la invención se refiere a un concepto novedoso para analizar la vitamina D libre. Un problema con el análisis de la vitamina D libre es que la concentración original de vitamina D libre es muy baja y no puede medirse mediante inmunoensayos existentes. Los intentos existentes para resolver este problema se basan en el deseo de evitar la eliminación de la vitamina D de la DBP (por ejemplo, mediante los intentos de "estabilizar" el equilibrio entre la vitamina D libre y la ligada) o simplemente implican rendirse al hecho de que la DBP libre no puede analizarse, y estos ensayos solo involucran el desplazamiento de la vitamina D de la DBP.

- 55 En la invención, se prevé un secuestro limitado de vitamina D, en donde la fracción de vitamina D secuestrada es

suficientemente baja, preferiblemente 0,1-10% de la vitamina D total presente en la muestra, y preferiblemente no superior al 5% de la misma, para reflejar aún la concentración original de vitamina D libre.

5 Esto puede verificarse sin excesiva experimentación de manera simple mediante la adición de vitamina D tritiada y el regulador de dilución. La vitamina D unida a la proteína de unión a la vitamina D no debe disminuir en más del 5%. Alternativamente, la muestra puede ser absorbida a la pared de los pozos recubiertos con anticuerpos. Después de retirar la muestra, se agrega vitamina D biotinilada y se cuantifica la vitamina D libre, absorbida al anticuerpo. La muestra de la cual se extrae una cantidad inicial de vitamina D se introduce en un segundo pozo y se incuba y cuantifica nuevamente. La concentración medida de vitamina D libre debe ser la misma que el resultado de la primera incubación.

10 El secuestro limitado de vitamina D se logra mediante la adición de 0,1 a 0,25% en peso del agente tensioactivo fluoroalquilo. El tensioactivo fluoroalquilo es ácido perfluorooctanoico (PFOA). Preferiblemente se usa 0,1 a 0,2%, más preferiblemente 0,15% de PFOA. Bajo estas condiciones, la respuesta de muestras con diferentes niveles de DBP, pero la misma concentración de vitamina D total, se correlacionó con la concentración de vitamina D libre medida por diálisis simétrica.

15 Una ventaja del método para determinar la vitamina D libre (incluidos los metabolitos de la vitamina D) de acuerdo con la invención es que proporciona un formato de ensayo que puede automatizarse. Esto distingue marcadamente el ensayo de la invención de cualquier ensayo preexistente para la determinación de la vitamina D libre.

20 En el ensayo de la invención, se añade una proteína de unión para 25-OH-vitamina D. Proteínas de unión, por ejemplo, los anticuerpos para la vitamina D son conocidos en la técnica y se usan ampliamente en los inmunoensayos existentes para la vitamina D. Estos mismos anticuerpos, así como otras proteínas de unión, también pueden usarse en la presente invención. Por ejemplo, en lugar de un anticuerpo para la vitamina D, se puede usar un fragmento de anticuerpo, tal como el producido con la tecnología de despliegue en fagos. Los anticuerpos adecuados pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales. Se pueden obtener de manera conocida, por ejemplo, anti-vitamina D policlonal de cabra, anti-vitamina D policlonal de conejo, o cualquier otro anticuerpo adecuado para la vitamina D como se conoce en la técnica para la aplicación en inmunoensayos para la vitamina D. Se conocen anticuerpos adecuados, por ejemplo, a partir de las siguientes referencias: Hollis, Clin. Chem 31/11, 1815-1819 (1985); Hollis, Clin. Chem 39/3, 529-533 (1993).

30 Las proteínas de unión se añaden preferiblemente en una forma particulada que comprende vehículos sólidos. Típicamente, la proteína de unión se recubre en una fase sólida, por ejemplo, en una placa de microtitulación. En una realización preferida, la proteína de unión se recubre sobre partículas magnéticas, lo que facilita su separación en un campo magnético.

35 Después de la adición de la proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo, se incuba la muestra. El tiempo requerido dependerá de circunstancias tales como la concentración de los reactivos, el tipo de proteína de unión y las condiciones durante la incubación, por ejemplo, agitación y temperatura. Generalmente, el tiempo de incubación estará en un intervalo de 10 segundos a varias horas, preferiblemente de 1 minuto a 2 horas. Para plataformas automatizadas, se prefieren tiempos de incubación cortos (de 10 segundos a 10 minutos, preferiblemente de 30 segundos a 30 minutos). Básicamente, el período de tiempo no es de particular relevancia, siempre y cuando se determine en un sistema de calibración la cantidad de vitamina D libre que debe unirse bajo las circunstancias, durante el período de tiempo deseado. Los períodos de tiempo más cortos y más largos son expresamente posibles, siempre que se lleve a cabo la calibración adecuada. Por lo tanto, preferiblemente, la comparación con los calibradores implica el mismo período de tiempo, bajo las mismas condiciones.

45 Después del período de incubación, la muestra puede someterse de una manera conocida a un ensayo de unión competitiva utilizando un compuesto de vitamina D marcado. Se conocen numerosos compuestos marcados que pueden servir como antígenos de unión competitiva en inmunoensayos para la determinación de vitamina D. Los marcadores típicos son radiomarcadores, marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes, marcadores de biotina, marcadores de oro, marcadores enzimáticos. Los ensayos de unión competitiva son conocidos por los expertos, y no requieren una explicación, especialmente porque esta parte del método de la invención se puede llevar a cabo utilizando cualquier marcador que se sepa que es adecuado para la determinación de la vitamina D. Los marcadores que se pueden usar son, entre otros, los descritos en las referencias anteriores sobre inmunoensayos de vitamina D existentes.

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

55 La calibración para el ensayo de la invención se realiza proporcionando calibradores que comprenden una concentración predeterminada de 25-OH-vitamina D libre. La fracción de vitamina D libre en estos calibradores se puede determinar mediante diálisis simétrica. En diálisis simétrica, una muestra de suero se carga en un lado de una celda de diálisis. El otro compartimento se carga con la misma muestra en la que se agrega una cantidad mínima de vitamina D radiomarcada. La tasa de migración de la vitamina D radiomarcada de un compartimento de diálisis a otro es directamente proporcional a la fracción libre de vitamina D (7).

La medición de vitamina D libre de acuerdo con la invención se basa en la evaluación de la concentración de vitamina D libre sin afectar sustancialmente la concentración de vitamina D libre, pero sobre la base de un secuestro limitado de vitamina D como se discutió anteriormente.

5 La invención, en otro aspecto, presenta un producto en forma de un kit para la determinación de 25-OH vitamina D en sangre o componentes sanguíneos, en el que el ensayo hace uso de un método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores. Dicho kit comprende los reactivos individuales involucrados, es decir, una proteína de unión para la vitamina D inmovilizada en una fase sólida, un compuesto de vitamina D marcado, un calibrador que comprende una concentración predeterminada de 25-OH vitamina D libre, y una solución reguladora con un pH regulado en el intervalo de 6,0 a 8,0, comprendiendo dicha solución ácido perfluorooctanoico en una concentración de 10 0,1-0,25% en peso. Estos reactivos pueden proporcionarse por separado y, por lo tanto, forman un kit solo después de su uso en el ensayo de la invención. Preferiblemente, los reactivos se proporcionan juntos, preferiblemente empacados juntos, como un kit de partes. El kit comprende opcionalmente un contenedor para una muestra de sangre o componentes sanguíneos, pero como es habitual, esto también puede proporcionarse por separado. Típicamente, un kit comprende un aglutinante inmovilizado en una fase sólida y una vitamina D conjugada separada. Otros 15 componentes del kit dependerán, como es habitual en la técnica, del marcador elegido, ya que diferentes marcadores pueden requerir diferentes reactivos.

Debe entenderse que en las reivindicaciones la palabra "que comprende" no excluye otros elementos o etapas. Cuando se usa un artículo indefinido o definido al referirse a un sustantivo singular, por ejemplo, "un" o "uno, una", "el, la", este incluye el plural de ese sustantivo a menos que se indique específicamente lo contrario.

20 La invención se ilustrará con referencia al siguiente Ejemplo no limitativo y la Figura no limitativa adjunta.

Ejemplo

Materiales

Placas de microtitulación recubiertas

25 Las microplacas de titulación MaxiSorp Nunc se recubrieron con un anticuerpo IgG anti-ratón a una concentración de 200 ng/pozo. Posteriormente, se absorbió una capa de anticuerpo monoclonal anti-25(OH)vitamina D sobre la capa anti-IgG de ratón a una concentración de 2 ng/pozo. Las placas se bloquearon con un regulador borato que contenía BSA y sacarosa.

El diluyente de la muestra.

30 El diluyente de la muestra consiste en un regulador TRIS 0,1M de pH 8,0 que contiene conservantes y un 0,15% de PFOA.

El conjugado (es decir, el compuesto de vitamina D marcado) es vitamina D biotinilada. El conjugado se presentó a una concentración de 25 pg/mL en regulador Tris 0,1 M de pH 7,5 que contiene albúmina de suero bovino al 0,1% y conservantes.

La estreptavidina-HRP y TMB procedían de una fuente comercial.

35 Protocolo

El ensayo se realiza de la siguiente manera. En el pozo de una placa de microtitulación, se pipetea 90 μ L de diluyente de la muestra. A continuación, se añaden 10 μ L de muestra al diluyente. Esta mezcla se incuba durante 90 minutos a 37 °C. Posteriormente, los pozos se lavan tres veces con regulador de lavado. Se añaden 100 μ L del conjugado con HRP a la cubeta y se incuba durante 30 minutos. Nuevamente los pozos se lavan tres veces con regulador de lavado. 40 Luego se genera una señal colorimétrica mediante la adición de estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante. Después de 20 minutos de incubación a 37°C, los pozos se lavan tres veces con regulador de lavado. Posteriormente, se añaden 100 μ L de solución TMB a los pozos. Después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad, se agregan 100 μ L de solución de detención y se lee la absorbancia a 450 nm.

45 La señal generada en el pozo es inversamente proporcional a la concentración de 25(OH)vitamina D libre en la muestra o el calibrador. La concentración de 25(OH)vitamina D libre en la muestra original se puede calcular comparando la señal de los desconocidos con la respuesta de los calibradores.

Resultados

Usando el ensayo de la invención en muestras de referencia estándar, se genera una curva de calibración típica para la medición de 25(OH)vitamina D libre y se ilustra en la tabla a continuación.

50

ES 2 707 811 T3

Calibradores	Calibrador A	Calibrador B	Calibrador C	Calibrador D	Calibrador E
25(OH)D3 libre [pg/mL]	1,1 pg/mL	4,2 pg/mL	8,6 pg/mL	16,2 pg/mL	41,6 pg/mL
Absorbancia 450 nm	2,304	1,856	1,177	0,514	0,132
Absorbancia 450 nm	2,291	1,808	1,151	0,517	0,123
OD promedio	2,298	1,832	1,164	0,516	0,128
% de CV	0,40%	1,85%	1,58%	0,41%	4,99%
Porcentaje de unión	100%	80%	51%	22%	6%

Muestras de sangre o componentes sanguíneos de sujetos humanos o animales, por ejemplo, de los pacientes, se pueden someter al ensayo de la invención. Las cantidades medidas de vitamina D se pueden correlacionar con la curva de calibración y, por lo tanto, interpretarse.

REIVINDICACIONES

1. Un método para analizar una muestra de sangre o componentes sanguíneos en busca de la presencia de vitamina D libre, incluidos los metabolitos de la vitamina D, como la 25-hidroxi-vitamina D o la 1,25 dihidroxivitamina D, que comprende
- 5 (a) agregar una proteína o anticuerpo de unión inmovilizado para 25-OH vitamina D a la muestra;
- (b) mezclar la muestra con un diluyente, comprendiendo dicho diluyente un tensioactivo fluoroalquilo;
- (c) incubar la muestra durante una cantidad efectiva de tiempo para permitir que una cantidad deseada de vitamina D se una a la proteína o al anticuerpo de unión;
- (d) eliminar el suero no unido y los componentes del suero mediante lavado;
- 10 (e) someter la proteína o anticuerpo de unión inmovilizado que comprende la vitamina D capturada unida al mismo, a la unión competitiva con un compuesto de vitamina D marcado;
- (f) determinar la concentración del compuesto de vitamina D marcado unido a la proteína o el anticuerpo de unión, en donde la concentración se determina con referencia a una concentración del calibrador para 25-OH vitamina D libre, en donde el tensioactivo fluoroalquilo es ácido perfluorooctanoico y en donde la concentración de el tensioactivo es de 0,1-0,25% en peso.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el diluyente es una solución reguladora, que tiene un pH regulado en el intervalo de 6,0 a 8,0.
3. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra es suero humano o plasma.
- 20 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína de unión se proporciona en una forma recubierta sobre partículas magnéticas.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el compuesto de vitamina D marcado comprende un marcador seleccionado del grupo que consiste en radiomarcadores, marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes, marcadores de biotina, marcadores de oro, marcadores enzimáticos.
- 25 6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende en una primer etapa la captura de vitamina D en una proteína o anticuerpo de unión inmovilizada para la vitamina D, y en una etapa subsiguiente someter la vitamina D capturada a un ensayo de unión competitivo contra una variante de vitamina D marcada, en el que la captura de vitamina D libre se efectúa mediante el secuestro de una cantidad de vitamina D unida, en el que la fracción de vitamina D secuestrada es 0,1-10% en peso de la vitamina D total presente en la muestra, y preferiblemente que no exceda el 5% en peso de la misma para satisfacer una prueba de repetición, en el que la muestra de la cual se capturó la vitamina D se somete a las mismas etapas de captura de la vitamina D y se somete a la vitamina D capturada al mismo ensayo de unión competitiva, y en el que la concentración medida de vitamina D libre después de ambos ensayos de unión competitiva es sustancialmente la misma.
- 30 7. Un kit para realizar un inmunoensayo utilizando el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, comprendiendo el kit una proteína de unión para la vitamina D inmovilizada en una fase sólida, un compuesto de vitamina D marcado, un calibrador que comprende una concentración predeterminada de 25-OH vitamina D libre y una solución reguladora que tiene un pH regulado en el intervalo de 6,0 a 8,0; comprendiendo dicha solución ácido perfluorooctanoico en una concentración de 0,1-0,25% en peso.
- 35

Fig. 1

