

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 449**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53	(2006.01)
C07K 16/26	(2006.01)
C07H 21/00	(2006.01)
C07K 16/44	(2006.01)
G01N 33/82	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.05.2012 PCT/US2012/038637**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2012 WO12162165**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2012 E 12789177 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2710376**

54 Título: **Anticuerpos para 25-hidroxivitamina D2 y D3 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

20.05.2011 US 201161488630 P
27.04.2012 US 201213458847

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.04.2019

73 Titular/es:

SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)
511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

CAMPBELL, BRUCE, A.;
LIN, SPENCER, HSIANG-HSI;
LIAO, QIMU;
SAHAKIAN, NIVER, PANOSIAN;
FREEMAN, JAMES, VINCENT y
EVANGELISTA, RAMON, A.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 710 449 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

Anticuerpos para 25-hidroxivitamina D₂ y D₃ y usos de los mismos

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de los Estados Unidos n.º 13/458.847, presentada el 27 de abril de 2012, que reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los Estados Unidos n.º 61/488.630, presentada el 20 de mayo de 2011.

Campo técnico

10 Se proporcionan en el presente documento métodos y reactivos para la detección o cuantificación de 25-hidroxivitamina D₂ y D₃, métodos para estabilizar análogos de vitamina D y métodos para separar 25-hidroxivitamina D₂ y D₃ de proteína de unión a vitamina D en una muestra biológica.

Antecedentes

La vitamina D es una hormona esteroidea implicada en la absorción intestinal del calcio y la regulación de la homeostasis del calcio. La vitamina D es esencial para la formación y el mantenimiento de huesos fuertes, sanos.

15 La deficiencia en vitamina D puede resultar de exposición insuficiente al sol, consumo alimentario insuficiente, absorción reducida, metabolismo anómalo o resistencia a la vitamina D. La deficiencia en vitamina D se ha asociado al raquitismo, osteomalacia, osteoporosis, tensión arterial alta, enfermedad cardiovascular, esquizofrenia, depresión, enfermedades del sistema nervioso, diabetes, enfermedades infecciosas, asma, alergias, cáncer y varias enfermedades autoinmunitarias.

20 Bien consumida o bien producida, ambas formas de vitamina D (D₂ y D₃) son metabolizadas por el hígado a 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) y después se convierten en el hígado o riñón a 1,25-dihidroxivitamina D. Los metabolitos de vitamina D se unen con una proteína vehículo en el plasma y se distribuyen por todo el cuerpo. Se admite en general que 25(OH)D es el metabolito que es el indicador clínico más fiable del estado de vitamina D debido a que los niveles de 25(OH)D en suero reflejan los niveles de almacenamiento del cuerpo de la vitamina D y se correlacionan con síntomas clínicos de la deficiencia en vitamina D.

25 A pesar del valor de la detección de la vitamina D para la gestión sanitaria, los ensayos precisos y sensibles para la detección de vitamina D o sus derivados están limitados. Un obstáculo para el desarrollo de ensayos exitosos para la vitamina D ha sido la dificultad técnica para el aislamiento de 25-hidroxivitamina D₃ y 25-hidroxivitamina D₂ unidas estrechamente de su proteína de unión a vitamina D (DBP) en muestras biológicas de ensayo. DBP es una glucoproteína del suero que se une con esteroides de vitamina D, G-actina, ácidos grasos y agentes quimiotácticos.
30 Swamy *et al.*, Archives of Biochemistry and Biophysics 402: 14-23 (2002). En plasma, 25-hidroxivitamina D₃ y 25-hidroxivitamina D₂ tienen una semivida de dos a tres semanas y aun así solo están presentes en menos de 0,05 % en forma libre. La mayoría está unida a DBP con una afinidad de asociación de hasta 10⁹ M⁻¹ que implica unión a hidrógeno así como interacciones hidrófobas. Además, el documento WO2011/051348 A1 se dirige a un proceso para la producción de un híbrido y un anticuerpo obtenido del mismo capaz de reconocer 25-hidroxivitamina D₂ y 25-hidroxivitamina D₃, en donde el reconocimiento de D₂ y D₃ varía entre 75 % y 110 %.

Otro obstáculo en el desarrollo de un inmunoensayo de unión competitiva para vitamina D es la inestabilidad del análogo de vitamina D usado para competir por los sitios de unión a anticuerpo con la vitamina D en muestras biológicas. La vitamina D en ausencia de DBP es altamente inestable en muestras biológicas o soluciones tamponadas.

40 Existe por lo tanto la necesidad de métodos de ensayo que detectan y/o cuantifican con precisión vitamina D y derivados de vitamina D presentes en muestras biológicas en forma libre o unidos a DBP.

Sumario

45 Se describen en el presente documento moléculas antigénicas que pueden usarse para generar anticuerpos capaces de unirse con moléculas procedentes de vitamina D. En algunas realizaciones, la molécula antigénica puede conjugarse con una proteína transportadora para formar un compuesto antigénico. La conjugación de proteína transportadora con la molécula antigénica puede producirse mediante el uso de un conector químico. En algunas realizaciones la proteína antigénica puede dar lugar a anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales, que se unen con diferentes derivados de vitamina D. Muchas de las moléculas antigénicas descritas incorporan un inmunógeno de vitamina D-C22 (Figura 1(a)). Más específicamente, se desvelan en el presente documento inmunógenos de vitamina D-C22 conjugados con albúmina de suero bovino (BSA) para producir vitamina D-C22 diaminobutano-suberoil-BSA

(vitamina D-C22 BSA) (Figura 1(c)). Como alternativa, la vitamina D-C22 puede conjugarse con KLH para producir vitamina D-C22 diaminobutano-suberoil-KLH (vit D-C22 KLH) (Figura 1(d)). Las moléculas antigénicas y los compuestos antigénicos descritos proporcionados en el presente documento pueden usarse para producir anticuerpos reactivos a antígeno en un mamífero, tal como un ratón. A su vez, los mamíferos inmunizados pueden usarse como una fuente de linfocitos B para producir líneas celulares de hibridomas clonales que producen anticuerpos monoclonales reactivos a antígeno.

También se desvelan en el presente documento anticuerpos aislados según la reivindicación 1 que pueden unirse con un derivado de vitamina D, tal como 25-hidroxivitamina D2 y/o 25-hidroxivitamina D3, o un análogo de 25-hidroxivitamina D, tal como una molécula inmunogénica o compuesto de vitamina D-C22. En algunas realizaciones los anticuerpos descritos son anticuerpos monoclonales. En algunos aspectos los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno descritos tienen una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26, una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 y una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28. Dicho anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 10H9 que se describe en el presente documento. Como se describirá adicionalmente, los anticuerpos proporcionados en el presente documento, aunque son de naturaleza monoclonal, tiene la capacidad de unirse preferentemente con más de un antígeno. A este respecto, algunos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento pueden unirse con 25-hidroxivitamina D2 y 25-hidroxivitamina D3 de una manera esencialmente indistinguible. También se proporcionan polinucleótidos que codifican los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno descritos para propagación y/o expresión de los polinucleótidos descritos.

Se desvelan además en el presente documento métodos para detectar deficiencia en vitamina D en un sujeto determinando el nivel de 25-hidroxivitamina D total en una muestra biológica procedente del sujeto en donde una reducción entre el nivel en la muestra biológica en relación con el nivel en una muestra de control o un nivel umbral de 30 ng/ml es indicativa de una deficiencia en vitamina D en el sujeto.

También se desvelan en el presente documento métodos para tratar a un sujeto que se sospecha que tiene una deficiencia en vitamina D determinando el nivel de 25-hidroxivitamina D total en una muestra biológica procedente del sujeto y, en el caso de que se detecte una reducción entre el nivel en la muestra biológica en relación con el nivel en un control normal o un nivel umbral de 30 ng/ml, administrar al sujeto un tratamiento para deficiencia en vitamina D.

También se desvelan en el presente documento métodos para supervisar la progresión, regresión o estabilización de deficiencia en vitamina D en un sujeto que lo necesite determinando el nivel de 25-hidroxivitamina D en una primera muestra biológica procedente del sujeto en un primer momento y determinar después el nivel de 25-hidroxivitamina D total en una segunda muestra biológica procedente del sujeto en un segundo momento posterior al primer momento en donde una reducción entre el nivel de la primera muestra biológica y el nivel en la segunda muestra biológica es indicativa de la progresión o el empeoramiento de una deficiencia en vitamina D en el sujeto, en donde poco o ningún cambio entre el nivel en la primera muestra biológica y el nivel en la segunda muestra biológica es indicativo de estabilización de una deficiencia en vitamina D en el sujeto, y en donde un aumento entre el nivel en la primera muestra biológica y el nivel en la segunda muestra biológica es indicativo de regresión o mejora de una deficiencia en vitamina D en el sujeto.

También se desvelan en el presente documento métodos para supervisar el tratamiento de la deficiencia en vitamina D en un sujeto que lo necesita determinando el nivel de 25-hidroxivitamina D total en una primera muestra biológica procedente del sujeto en un primer momento y determinando después el nivel de 25-hidroxivitamina D total en una segunda muestra biológica procedente del sujeto en un segundo momento posterior al primer momento y después del tratamiento del sujeto para dicha deficiencia en vitamina D en donde un aumento o una estabilización del nivel en la segunda muestra biológica en relación con el nivel en la primera muestra biológica es indicativo de eficacia del tratamiento de la deficiencia en vitamina D en dicho sujeto, y en donde una reducción del nivel en la segunda muestra biológica es indicativa de ineficacia del tratamiento de la deficiencia en vitamina D en dicho sujeto.

Se desvelan métodos para estabilizar análogos de 25-hidroxivitamina D poniendo en contacto el análogo de 25-hidroxivitamina D con sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS). El ANS puede estar en forma de un ácido o una sal de ANS (por ejemplo, sal de sodio de ANS, sal de potasio de ANS, sal de magnesio de ANS o sal de amonio de ANS).

También se desvelan en el presente documento métodos para detectar deficiencia en vitamina D en un sujeto. Los métodos para detectar deficiencia en vitamina D en un sujeto implican determinar el nivel de 25-hidroxivitamina D total en una muestra biológica procedente del sujeto combinando la muestra biológica y un tampón de desplazamiento. En realizaciones preferidas, el tampón de desplazamiento contiene sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS). El ANS puede estar en forma de un ácido o una sal de ANS (por ejemplo, sal de sodio de ANS, sal de potasio de ANS, sal de magnesio de ANS o sal de amonio de ANS). El tampón de desplazamiento puede contener además etilenglicol. En algunas realizaciones, el tampón de desplazamiento contiene ANS y metanol. En algunas realizaciones preferentes, el tampón de desplazamiento contiene ANS, etilenglicol y metanol. A continuación, un anticuerpo o fragmento de unión

a antígeno que se une preferentemente con un derivado de vitamina D, tal como 25-hidroxitamina D2 y/o 25-hidroxitamina D3, o un análogo de 25-hidroxitamina D, tal como una molécula inmunogénica o compuesto de vitamina D-C22, conjugado con un primer marcador se combina con la mezcla de ensayo. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une preferentemente con un derivado de vitamina D, tal como 25-hidroxitamina D2 y/o 25-hidroxitamina D3, o un análogo de 25-hidroxitamina D, tal como una molécula inmunogénica o compuesto de vitamina D-C22, es preferentemente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se describe en el presente documento, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende una CDR1 de Lc de la SEQ ID NO: 26, una CDR2 de Lc de la SEQ ID NO: 27 y una CDR3 de Lc de la SEQ ID NO: 28, una CDR1 de Hc de la SEQ ID NO: 10, una CDR2 de Hc de la SEQ ID NO: 11 y una CDR3 de Hc de la SEQ ID NO: 12. El anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 10H9. A continuación se combina un análogo de 25-hidroxitamina D que tiene un segundo marcador con la mezcla de ensayo. El análogo de 25-hidroxitamina D puede estar presente en un tampón de estabilización que comprende sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS). El ANS puede estar en forma de un ácido o una sal de ANS (por ejemplo, sal de sodio de ANS, sal de potasio de ANS, sal de magnesio de ANS o sal de amonio de ANS). En algunas realizaciones, el análogo de 25-hidroxitamina D está conjugado con una proteína transportadora. Un soporte de fase sólida conjugado con un anticuerpo que reconoce el segundo marcador también se combina con la mezcla de ensayo. El nivel de 25-hidroxitamina D total en la muestra biológica se determina midiendo la señal emitida por el primer marcador, en donde un nivel reducido de 25-hidroxitamina D en la muestra biológica en relación con el nivel en un control normal o un nivel umbral de 30 ng/ml es indicativo de una deficiencia en vitamina D en el sujeto.

20 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa la estructura química de moléculas y compuestos antigénicos de vitamina D-C22. La Figura 1(a) representa una molécula de vitamina D-C22 no conjugada. La Figura 1(b) proporciona una representación de un compuesto antigénico de vitamina D-C22 general. Las Figuras 1(c) y 1(d) muestran compuestos antigénicos de vitamina D-C22 específicos, donde la vitamina D-C22 está conjugada con BSA o KLH mediante un conector: D-C22 diamino-butano-suberoil-BSA (Figura 1(c)) y D-C22 diamino-butano-suberoil-KLH (Figura 1(d)).

La Figura 2 muestra un proceso químico para producir ácido de vit D-C22.

La Figura 3 representa un proceso químico para convertir ácido de vit D-C22 a vitD-DAB-Suberoil-NHS o vitD-DAB-PEG5-NHS.

La Figura 4 ilustra esquemas de reacción química para conjugar vit D-C22, vitD-DAB-Suberoil-NHS o vitD-DAB-PEG5-NHS con un vehículo proteico.

La Figura 5 muestra una reacción de dos etapas para producir un conjugado de vitamina D-DAB-PEG5-BSA-Fluoresceína.

La Figura 6 proporciona una representación gráfica del grado de unión entre vitamina D-C22-Diamino-butano-Suberoil KLH y el anticuerpo del sobrenadante de hibridoma 10H9 en presencia o ausencia de 25-hidroxitamina D2 o 25-hidroxitamina D3.

La Figura 7 es una representación gráfica del grado de unión entre vitamina D C22-diamino-butano-suberoil-fosfatasa alcalina y anticuerpo monoclonal 10H9 purificado en presencia o ausencia de 25-hidroxitamina D2 o 25-hidroxitamina D3.

La Figura 8 muestra un esquema del ensayo de Vitamina D Total ADVIA Centaur. Este esquema es solamente para fines ilustrativos y no debería interpretarse como limitante en modo alguno.

La Figura 9 muestra el perfil de precisión que muestra el límite de detección (LoD) y la sensibilidad funcional (línea discontinua) del ensayo de Vitamina D Total ADVIA Centaur.

La Figura 10 muestra la correlación de los niveles de Vitamina D Total recogidos de 119 donantes en tubos de suero de tapón rojo y SST y la sensibilidad funcional.

La Figura 11 muestra la correlación de niveles de Vitamina D Total recogidos de 119 donantes en tubos de suero de tapón rojo y EDTA.

La Figura 12 muestra la correlación del ADVIA Centaur y un ensayo de Vitamina D Total disponible en el mercado.

La Figura 13 muestra la correlación de los ensayos de Vitamina D Total ADVIA Centaur y CL-EM/EM.

La Figura 14 proporciona una descripción anotada de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal 10H9.

La Figura 15 proporciona una descripción anotada de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal 10H9.

5 Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas

A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones se usan diversos términos relacionados con aspectos de la descripción. A tales términos se les debe proporcionar su significado habitual en la técnica, a menos que se indique lo contrario. Otros términos definidos específicamente deben interpretarse de un modo coherente con las definiciones proporcionadas en el presente documento.

10 Como se usan en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno", "una", y "el" o "la", incluyen referencias en plural a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una combinación de dos o más células, y similares.

15 Se entiende que el término "aproximadamente" como se usa en el presente documento cuando se hace referencia a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, abarca variaciones de hasta ± 20 % desde el valor especificado, ya que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos desvelados.

A menos que se indique de otro modo, debe entenderse que todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción y así sucesivamente que se usan en la memoria descriptiva y reivindicaciones están modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la siguiente memoria
20 descriptiva y reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener mediante la presente invención. Como mínimo, y no en un intento de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos indicados y mediante la aplicación de técnicas de redondeo habituales.

25 A pesar de que los intervalos numéricos y parámetros que establecen el amplio alcance de la invención sean aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se presentan de la forma más precisa posible. Cualquier valor numérico, sin embargo, contiene de forma inherente algunos errores que son necesariamente el resultado de la desviación típica que se encuentra en sus respectivas mediciones de ensayo.

30 "Aislado" significa alterado "por la mano del hombre" con respecto al estado natural. Si una molécula o composición aparece en la naturaleza, se ha "aislado" si se ha cambiado o retirado de su ambiente original, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido presente de forma natural en una planta o un animal vivo no está "aislado", pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado" como se emplea el término en el presente documento.

35 "Polinucleótido", denominado de forma sinónima "molécula de ácido nucleico" o "ácidos nucleicos", se refiere a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Los "polinucleótidos" incluyen, sin limitación, ADN mono y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarios o, más habitualmente, regiones bicatenarias o una mezcla de mono y bicatenarias. Además, "polinucleótido" se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN
40 o ADN o tanto ARN como ADN. El término polinucleótido también incluye ADN o ARN que contienen una o más bases modificadas y ADN o ARN con cadenas principales modificadas para mayor estabilidad o por otras razones. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases infrecuentes tales como inosina. Puede realizarse una diversidad de modificaciones al ADN y ARN; por lo tanto, "polinucleótido" abarca formas modificadas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente de polinucleótidos como se encuentran habitualmente en la naturaleza, así como
45 las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células. "Polinucleótido" también abarca cadenas de ácido nucleico relativamente cortas, que a menudo se denominan oligonucleótidos.

"Sustancialmente igual" con respecto a secuencias de ácido nucleico o aminoácidos, significa al menos 65 % de identidad entre dos o más secuencias. Preferentemente, la expresión se refiere a al menos 70 % de identidad entre dos o más secuencias, más preferentemente al menos 75 % de identidad, más preferentemente al menos 80 % de identidad, más preferentemente al menos 85 % de identidad, más preferentemente al menos 90 % de identidad, más preferentemente al menos 91 % de identidad, más preferentemente al menos 92 % de identidad, más preferentemente al menos 93 % de identidad, más preferentemente al menos 94 % de identidad, más preferentemente al menos 95 % de identidad, más preferentemente al menos 96 % de identidad, más preferentemente al menos 97 % de identidad, más preferentemente al menos 98 % y más preferentemente al menos 99 % o mayor identidad. Dicha identidad puede determinarse usando el algoritmo mBLAST (Altschul *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-8; Karlin y
55

Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-7).

Un "vector" es un replicón, tal como un plásmido, fago, cósmido o virus en el que otro segmento de ácido nucleico puede insertarse operativamente para causar la replicación o expresión del segmento.

5 La expresión "unido operativamente" o "insertado operativamente" significa que las secuencias reguladoras necesarias para expresión de la secuencia codificante se sitúan en una molécula de ácido nucleico en las posiciones apropiadas relativas a la secuencia codificante para permitir la expresión de la secuencia codificante. A modo de ejemplo, un promotor se une operativamente con una secuencia codificante cuando el promotor es capaz de controlar la transcripción o expresión de esa secuencia codificante. Las secuencias codificantes pueden unirse operativamente a promotores o secuencias reguladoras en una orientación con sentido o antisentido. La expresión "unido
10 operativamente" se aplica en ocasiones a la disposición de otros elementos de control de la transcripción (por ejemplo, potenciadores) en un vector de expresión.

15 Una célula se ha "transformado" cuando se han introducido ácidos nucleicos exógenos o heterólogos tales como ADN dentro de la célula. El ADN transformante puede integrarse (unirse de forma covalente) o no en el genoma de la célula. En procariontes, levadura y células de mamífero por ejemplo, el ADN transformante puede mantenerse en un elemento episómico tal como un plásmido. Con respecto a células eucariotas, una célula transformada de forma estable o "célula estable" es demostrada por la capacidad de la célula eucariota para establecer líneas celulares o clones comprendidos por una población de células descendientes que contienen el ADN transformante. Un "clon" es una población de células procedentes de una única célula o ancestro común por mitosis. Una "línea celular" es un clon de una célula primaria que tiene capacidad de crecimiento estable *in vitro* durante muchas generaciones. En algunos ejemplos
20 proporcionados en el presente documento, las células se transforman transfeciendo las células con ADN.

"Polipéptido" se refiere a cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos. "Polipéptido" se refiere tanto a cadenas cortas, habitualmente denominadas péptidos, oligopéptidos u oligómeros, como a cadenas más largas, generalmente denominadas proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos
25 codificados por genes. Los "polipéptidos" incluyen secuencias de aminoácidos modificadas mediante procesos naturales, tales como procesamiento postraduccional, o mediante técnicas de modificación química que son bien conocidas en este campo. Dichas modificaciones están bien descritas en textos básicos, monografías y bibliografía de investigación. Pueden producirse modificaciones en cualquier parte de un polipéptido, incluyendo la cadena principal peptídica, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo. El mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo o diversos grados en varios sitios en un polipéptido dado. Además, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden ramificarse como resultado de la ubiquitinación y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de procesos postraduccionales naturales o pueden realizarse mediante métodos
35 sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de anclaje a GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición
40 mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tal como arginilación y ubiquitinación (véase, por ejemplo, Proteins - Structure and Molecular Properties, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York, 1993 y Wold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, pág. 1-12 en Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, 1983; Seifter *et al.*, Analysis for Protein Modifications and Nonprotein Cofactors, Meth Enzymol (1990) 182:626-646 y Rattan *et al.*, Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging, Ann NY Acad Sci (1992) 663:48-62).
45

Las "biomoléculas" incluyen proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos, lípidos, monosacáridos, polisacáridos y todos los fragmentos, análogos, homólogos, conjugados y derivados de los mismos.

50 Los términos "expresar" y "producir" se usan de forma sinónima en el presente documento y se refieren a la biosíntesis de un producto génico. Estos términos abarcan la transcripción de un gen a ARN. Estos términos también abarcan la traducción de ARN a uno o más polipéptidos y abarcan además todas las modificaciones postranscripcionales y postraduccionales de origen natural. La expresión o producción de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser dentro del citoplasma de la célula o al medio extracelular tal como el medio de cultivo de un cultivo celular.

55 "Anticuerpo" se refiere a todos los isotipos de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgE, IgM, IgD e IgY) incluyendo diversas formas monoméricas y poliméricas de cada isotipo, a menos que se especifique lo contrario.

Un fragmento de unión a antígeno es cualquier estructura proteica que pueda mostrar afinidad de unión por un

antígeno particular. Algunos fragmentos de unión a antígeno están compuestos de partes de anticuerpos intactos que conservan la especificidad de unión a antígeno de la molécula de anticuerpo parental. Por ejemplo, los fragmentos de unión a antígeno pueden comprender al menos una región variable (una región variable bien de cadena pesada o bien de cadena ligera) o una o más CDR de un anticuerpo que se sabe que se une con un antígeno particular. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno adecuados incluyen, sin limitación, diacuerpos y moléculas monocatenarias así como moléculas de Fab, F(ab')₂, Fc, Fabc y Fv, anticuerpos monocatenarios (Mc), cadenas ligeras de anticuerpos individuales, cadenas pesadas de anticuerpos individuales, fusiones quiméricas entre cadenas de anticuerpos o CDR y otras proteínas, armazones proteicos o moléculas, monómeros o dímeros de cadena pesada, monómeros o dímeros de cadena ligera, dímeros que consisten en una cadena pesada y una ligera, y similares. Todos los isotipos de anticuerpos pueden usarse para producir fragmentos de unión a antígeno. Adicionalmente, los fragmentos de unión a antígeno pueden incluir estructuras proteicas distintas de anticuerpos que pueden incorporar con éxito segmentos polipeptídicos en una orientación que confiere afinidad para un antígeno de interés dado, tales como armazones proteicos. Los fragmentos de unión a antígeno se pueden producir de forma recombinante o producirse mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. La expresión "un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo" puede usarse para indicar que un fragmento de unión a antígeno dado incorpora uno o más segmentos de aminoácidos del anticuerpo al que se hace referencia en la expresión.

Las "composiciones de anticuerpos" se refieren a anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos que están acoplados con al menos un vehículo, agente quimioterapéutico o resto de diagnóstico farmacéuticamente aceptable, como se describe en el presente documento.

La "unión específica" se refiere a la capacidad de un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, para unirse con una biomolécula particular con una afinidad que es mayor que con la que puede unirse a otras biomoléculas. Esta expresión se usa de forma sinónima con unión "preferente", lo que significa que una interacción de unión particular está favorecida por los componentes de interacción sobre una mayoría de, pero no todas, otras de estas interacciones.

Las realizaciones descritas en el presente documento no están limitadas a métodos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos particulares, que pueden, por supuesto, variar. Asimismo, la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir solamente anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno particulares y no se pretende que sea limitante.

Moléculas antigénicas y compuestos antigénicos

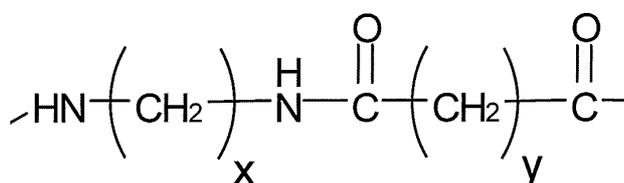
Se proporcionan en el presente documento moléculas antigénicas que pueden usarse para generar anticuerpos capaces de unirse con moléculas procedentes de vitamina D. En algunas realizaciones, la molécula antigénica puede conjugarse con una proteína transportadora para formar un compuesto antigénico. La conjugación de proteína transportadora con la molécula antigénica puede producirse mediante el uso de un conector químico. En algunas realizaciones la proteína antigénica puede dar lugar a anticuerpos que se unen igualmente con diferentes derivados de vitamina D.

Las moléculas antigénicas descritas en el presente documento se basan en el uso de un derivado de vitamina D de carbono 22 (vitamina D-C22), que incluye un grupo carboxilo C22 cuando no está conjugado, como se representa en la Figura 1(a) (Hollis *et al.*, Clin. Chem. 39(3):529-33 (1993)). Las moléculas antigénicas basadas en este compuesto conservan la parte común de 25-hidroxivitamina D2 y 25-hidroxivitamina D3, ya que estas moléculas difieren estructuralmente solamente en sus ramas laterales, que están ausentes de la molécula de vitamina D-C22. Dadas las semejanzas estructurales entre vitamina D-C22, 25-hidroxivitamina D2 y 25-hidroxivitamina D3, los anticuerpos generados usando antígenos basados en vitamina D-C22 pueden ser capaces de reconocer tanto 25-hidroxivitamina D2 como 25-hidroxivitamina D3.

Las moléculas antigénicas desveladas en el presente documento pueden combinarse con proteínas transportadoras para producir compuestos antigénicos. El uso de proteínas transportadoras puede ser útil para potenciar la capacidad de la molécula antigénica para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero. Por ejemplo, las proteínas transportadoras pueden permitir una semivida más larga en el hospedador o permitir que múltiples moléculas antigénicas se unan con el mismo vehículo, produciendo de este modo un compuesto antigénico multivalente. En algunas realizaciones, las moléculas antigénicas descritas pueden fijarse directamente al vehículo proteico. Por ejemplo, la vitamina D-C22 puede conjugarse directamente con albúmina de suero bovino (BSA). En algunas realizaciones, una pluralidad de moléculas antigénicas pueden conjugarse con la misma proteína transportadora para producir un compuesto antigénico multivalente. El número de moléculas antigénicas que puede conjugarse con un vehículo proteico dado variará basándose en el vehículo usado. Por ejemplo, BSA alojará la unión de un número relativamente bajo de moléculas antigénicas, quizás de aproximadamente 10 a aproximadamente 25; como alternativa, un vehículo tal como hemocianina de lapa californiana (KLH) puede alojar de aproximadamente 200 a aproximadamente 300 moléculas antigénicas. En una realización, la vitamina D-C22 se conjuga con BSA de modo que se conjugan de aproximadamente 7 a aproximadamente 21 moléculas antigénicas con el vehículo. En una realización, la vitamina D-C22 se conjuga con BSA de modo que se conjugan de aproximadamente 12 a aproximadamente 16 moléculas antigénicas con el vehículo. En otra realización de este tipo, se conjugan

aproximadamente 14 moléculas de vitamina D-C22 con un vehículo de BSA. Los expertos en la materia entenderán que puede usarse una amplia diversidad de proteínas transportadoras para los fines descritos en el presente documento. Algunos vehículos adecuados incluyen, KLH, KLH PEGilada, hemocianina de *Concholepas concholepas* (CCH), BSA cationizada y ovoalbúmina, por nombrar solo algunos. En algunas realizaciones las moléculas antigénicas se conjugan con la proteína transportadora mediante grupos amina presentes en la proteína transportadora. La química de conjugación de esta naturaleza es conocida habitualmente por los expertos en la materia.

Otro aspecto de los compuestos antigénicos descritos en el presente documento puede ser un conector químico que permite la conjugación indirecta de una molécula antigénica descrita con una proteína transportadora descrita. El conector químico puede estar compuesto por alquilo, arilo, alquiloxi, amida, sulfonamida o carbonilo o grupos peptídicos. La conjugación del derivado de vitamina D con la proteína puede realizarse mediante reacción entre grupos amino de la proteína y un grupo de éster de N-hidroxisuccinimida (éster de NHS) reactivo del derivado de vitamina D. La longitud del conector puede variar dependiendo del vehículo usado y el número de moléculas antigénicas conjugadas con el vehículo. En otras realizaciones, sin embargo, la misma molécula antigénica puede usarse con el mismo conector para conjugación con una diversidad de proteínas transportadoras, tales como BSA o KLH. En algunas realizaciones, el conector está compuesto de una cadena lineal que tiene la fórmula



donde x e y pueden variar, independientemente, de aproximadamente 1 a aproximadamente 12. Esto posibilita un compuesto antigénico general que tiene la fórmula representada en la Figura 1(b). En algunas realizaciones x puede ser 3 e y puede ser 6. En algunas realizaciones x puede ser 3 e y puede ser 7. En algunas realizaciones x puede ser 4 e y puede ser 7. En algunas realizaciones x puede ser 5 e y puede ser 7. En algunas realizaciones x puede ser 4 e y puede ser 6. En algunas realizaciones x puede ser 5 e y puede ser 6. En algunas realizaciones x puede ser 3 e y puede ser 5. En algunas realizaciones x puede ser 4 e y puede ser 5. En algunas realizaciones x puede ser 5 e y puede ser 5. En algunas realizaciones x puede ser 3 e y puede ser 4. En algunas realizaciones x puede ser 4 e y puede ser 4. En algunas realizaciones x puede ser 5 e y puede ser 4. En algunas realizaciones, el conector se usa para conjugar vitamina D-C22 y BSA para producir vitamina D-C22 diaminobutano-suberoil-BSA (vit D-C22 BSA) (Figura 1(c)). En otra realización el conector se usa para conjugar vitamina D-C22 y KLH para producir vitamina D-C22 diaminobutano-suberoil-KLH (vit D-C22 KLH) (Figura 1(d)).

Las moléculas antigénicas y los compuestos antigénicos proporcionados en el presente documento pueden usarse para producir anticuerpos reactivos a antígeno en un mamífero. Los mamíferos que pueden usarse para producir anticuerpos incluyen ratón, rata, cabra, caballo, cerdo, bovino, conejo, burro, ser humano y similares. En una realización, el mamífero es un ratón. Pueden usarse mamíferos que tienen sueros positivos para antígeno como una fuente de linfocitos B productores de anticuerpos que pueden aislarse y usarse para producir células productoras de anticuerpos de larga vida, tales como células de hibridoma. En algunas realizaciones, los linfocitos B aislados de ratones inmunizados pueden usarse para producir células de hibridomas que producen anticuerpos que se unen con vitamina D-C22 o derivados de vitamina D.

Anticuerpos

Se describen en el presente documento anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno aislados que se unen preferentemente con un derivado de vitamina D, tal como 25-hidroxivitamina D2 y/o 25-hidroxivitamina D3, o un análogo de 25-hidroxivitamina D, tal como una molécula inmunogénica o compuesto de vitamina D-C22. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno.

Hay cinco clases de inmunoglobulinas en donde la estructura primaria de la cadena pesada, en la región Fc, determina la clase de inmunoglobulina. Específicamente, las cadenas alfa delta, épsilon, gamma y mu corresponden a isotipos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos incluyen todos los isotipos y multímeros sintéticos de la estructura de inmunoglobulina tetracatenaria. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos también incluyen el isotipo IgY hallado en general en suero de gallina o pavo y yema de huevo de gallina o pavo. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno se unen de forma no covalente, preferentemente, y de forma no reversible con un antígeno.

Los anticuerpos según la reivindicación 1 de la materia objeto desvelada pueden proceder de cualquier especie. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden proceder de ratón, rata, cabra, caballo, cerdo,

bovino, conejo, burro, ser humano y similares. En algunas realizaciones los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno proceden de un ratón. En algunas realizaciones los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno proceden de un ratón inmunizado con un compuesto inmunogénico descrito en el presente documento. En algunas realizaciones los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno proceden de un ratón inmunizado con vitamina D-C22 BSA. Los anticuerpos según la reivindicación 1 son anticuerpos monoclonales producidos usando las moléculas inmunogénicas o compuestos descritos en el presente documento. Los anticuerpos monoclonales descritos pueden proceder de un ratón inmunizado con una cualquiera o más de las moléculas inmunogénicas o compuestos descritos en el presente documento. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, capaz de unirse preferentemente con un derivado de vitamina D, tal como 25-hidroxivitamina D2 y/o 25-hidroxivitamina D3, o un análogo de 25-hidroxivitamina D, tal como una molécula inmunogénica o compuesto de vitamina D-C22 puede proceder de un ratón inmunizado con una molécula inmunogénica o compuesto de vitamina D-C22.

En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden ser quiméricos. Como se usa en el presente documento, el término anticuerpo "quimérico", o fragmento de unión a antígeno del mismo, significa un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene al menos alguna parte de al menos un dominio variable procedente de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de un mamífero no humano, un roedor o un reptil, mientras que las partes restantes del anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, proceden de un ser humano. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender un dominio de unión a antígeno de ratón con un Fc humano u otro de dichos dominios estructurales.

En algunas realizaciones los anticuerpos descritos pueden ser humanizados. Por ejemplo, las CDR de un anticuerpo humano pueden reemplazarse con las CDR de cadena pesada y ligera descritas en el presente documento para producir un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene características de unión iguales o sustancialmente similares a los anticuerpos descritos en el presente documento, pero está compuesto de regiones constante y marco conservada humanas. Los expertos en la materia conocen habitualmente métodos para producir dichos anticuerpos.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento pueden marcarse o conjugarse de otro modo con diversos restos químicos o biomoleculares, por ejemplo, para aplicaciones de diagnóstico. Los restos pueden ser marcadores detectables, por ejemplo, marcadores quimioluminiscentes (por ejemplo, ésteres de acridinio y sulfonamidas, luminol e isoluminol), marcadores fosforescentes, marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC), marcadores quimioluminiscentes (por ejemplo, quelatos de rutenio (II)), donante de enzima clonada, partícula fotosensibilizadora o partícula quimioluminiscente para inmunoensayo de canalización de oxígeno luminiscente (LOCI), quelato de lantánido para inmunoensayo de fluorescencia resuelto en el tiempo (TRFIA), radiomarcadores, biotina, digoxigenina, enzimas y similares, por ejemplo, radionúclidos, tales como, pero sin limitación, tritio, carbono-14, plomo-212, bismuto-212, astatina-211, yodo-131, escandio-47, renio-186, renio-188, itrio-90, yodo-123, yodo-124, yodo-125, bromo-77, indio-111 y núclidos fisionables tales como boro-10 o un actínido. En algunas realizaciones las enzimas pueden conjugarse con los anticuerpos descritos o proteínas de unión a antígeno para los fines de detectar anticuerpo unido en una muestra. Dichos conjugados de enzimas incluyen, pero sin limitación, fosfatasa alcalina (AP), peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Los expertos en la materia entenderían que otras enzimas usadas para determinar unión a anticuerpo en inmunoensayos basados en solución son adecuadas para su uso como un conjugado para los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento. Además, también pueden conjugarse compuestos tales como ésteres de acridinio con los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno proporcionados para permitir la detección en un inmunoensayo.

La unión a anticuerpo se determina principalmente por las seis regiones CDR, especialmente CDR3 de cadena H (Kala *et al.*, 132 J. Biochem. 535-41 (2002); Morea *et al.*, 275 J. Mol. Biol. 269-94 (1998); y, Chothia *et al.*, 196 J. Mol. Biol. 901-17 (1987)). Las regiones de marco conservado de anticuerpo, sin embargo, pueden desempeñar un papel en interacciones de antígeno-anticuerpo (Panka *et al.*, 85 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 3080-4 (1988)), particularmente influyendo en la conformación de bucles de CDR (Foote *et al.*, 224 J. Mol. Biol. 487-99 (1992)). Por lo tanto, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos pueden comprender cualquier combinación de regiones FWR o CDR de cadena H o L que confieren unión preferente para 25-hidroxivitamina D2 y/o 25-hidroxivitamina D3 o inmunógenos basados en vitamina D-C22. Pueden emplearse experimentos de redistribución de dominios que se llevan a cabo rutinariamente en la técnica (Jirholt *et al.*, 215 Gene 471-6 (1998); Söderlind *et al.*, 18 Nature Biotechnology 852-6 (2000)), para generar anticuerpos que se unen preferentemente con 25-hidroxivitamina D2 y/o 25-hidroxivitamina D3 o inmunógenos basados en vitamina D-C22 según las especificaciones descritas y ejemplificadas en el presente documento. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno generados por dichos experimentos de redistribución de dominios están dentro del alcance de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento. Asimismo, las CDR pueden disponerse también para unirse con un antígeno dado modificando por ingeniería genética proteínas de tipo anticuerpo para actuar como armazón de CDR (Nicaise *et al.*, 13 Protein Sci. 1882 (2004)). Dichas proteínas de unión a antígeno están dentro del alcance de los anticuerpos descritos en el presente documento.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento pueden aparecer en una diversidad de formas, pero incluirán uno o más de los segmentos de anticuerpos mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Segmentos de anticuerpos de los anticuerpos descritos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos ("Lc" indica cadena ligera y "Hc" indica cadena pesada).

Segmento de anticuerpo 10H9	SEQ ID NO. de aminoácidos	SEQ ID NO. de ADN
CDR1 de Lc	26	18
CDR2 de Lc	27	19
CDR3 de Lc	28	20
FWR1 de Lc	29	21
FWR2 de Lc	30	22
FWR3 de Lc	31	23
FWR4 de Lc	25	17
dominio variable de Lc	32	24
CDR1 de Hc	10	2
CDR2 de Hc	11	3
CDR3 de Hc	12	4
FWR1 de Hc	13	5
FWR2 de Hc	14	6
FWR3 de Hc	15	7
FWR4 de Hc	9	1
dominio variable de Hc	16	8

Los anticuerpos según la reivindicación 1 comprenden una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10. Los anticuerpos según la reivindicación 1 comprenden una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11. Los anticuerpos según la reivindicación 1 comprenden una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12.

Los anticuerpos según la reivindicación 1 comprenden una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26.

Los anticuerpos según la reivindicación 1 comprenden una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 27.

Los anticuerpos según la reivindicación 1 comprenden una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 28.

Los anticuerpos según la reivindicación 1 comprenden una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10; una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11; y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12. Los anticuerpos según la reivindicación 1 comprenden una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26; una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 27; y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 28. Los anticuerpos según la presente invención comprenden una cadena pesada y una cadena ligera según la reivindicación 1. Las disposiciones de unión a antígeno de CDR también pueden modificarse por ingeniería genética usando proteínas de tipo anticuerpo como armazón de CDR. Dichas proteínas de unión a antígeno modificadas por ingeniería genética están dentro del alcance de la divulgación.

En el presente documento, se describen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que pueden incluir una secuencia de aminoácidos de FWR1 de cadena pesada sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 13.

En el presente documento, se describen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que pueden incluir una secuencia de aminoácidos de FWR2 de cadena pesada sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 14.

En el presente documento, se describen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que pueden incluir una secuencia de aminoácidos de FWR3 de cadena pesada sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 15.

En el presente documento, se describen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que pueden incluir una secuencia de aminoácidos de FWR1 de cadena ligera sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 29.

En el presente documento, se describen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que pueden incluir una secuencia de aminoácidos de FWR2 de cadena ligera sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 30.

En el presente documento, se describen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que pueden incluir una secuencia de aminoácidos de FWR3 de cadena ligera sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 31.

En el presente documento, se describen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que pueden incluir una cadena pesada que

tiene una secuencia de aminoácidos de FWR1 que es sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 13; una secuencia de aminoácidos de FWR2 que es sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 14; y una secuencia de aminoácidos de FWR3 que es sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 15. En el presente documento, se describen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que pueden incluir una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de FWR1 que es sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 29; una secuencia de aminoácidos de FWR2 que es sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 30; y una secuencia de aminoácidos de FWR3 que es sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 31. En el presente documento, se describen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que pueden incluir una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada incluye una secuencia de aminoácidos de FWR1 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 13; una secuencia de aminoácidos de FWR2 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 14; y una secuencia de aminoácidos de FWR3 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 15; y la cadena ligera incluye una secuencia de aminoácidos de FWR1 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 29; una secuencia de aminoácidos de FWR2 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 30; y una secuencia de aminoácidos de FWR3 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 31.

En el presente documento, se describen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que pueden incluir una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de CDR1 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 10; una secuencia de aminoácidos de CDR2 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 11; y una secuencia de aminoácidos de CDR3 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 12; una secuencia de aminoácidos de FWR1 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 13; una secuencia de aminoácidos de FWR2 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 14; y una secuencia de aminoácidos de FWR3 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 15. En el presente documento, se describen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que incluyen una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de CDR1 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 26; una secuencia de aminoácidos de CDR2 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 27; y una secuencia de aminoácidos de CDR3 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 28; una secuencia de aminoácidos de FWR1 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 29; una secuencia de aminoácidos de FWR2 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 30; y una secuencia de aminoácidos de FWR3 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 31. En el presente documento, se describen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que incluyen una cadena pesada y una ligera, en donde la cadena pesada incluye una secuencia de aminoácidos de CDR1 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 10; una secuencia de aminoácidos de CDR2 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 11; y una secuencia de aminoácidos de CDR3 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 12; una secuencia de aminoácidos de FWR1 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 13; una secuencia de aminoácidos de FWR2 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 14; y una secuencia de aminoácidos de FWR3 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 15; y la cadena ligera incluye una secuencia de aminoácidos de CDR1 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 26; una secuencia de aminoácidos de CDR2 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 27; y una secuencia de aminoácidos de CDR3 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 28; una secuencia de aminoácidos de FWR1 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 29; una secuencia de aminoácidos de FWR2 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 30; y una secuencia de aminoácidos de FWR3 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 31. Las disposiciones de unión a antígeno de CDR y FWR también pueden modificarse por ingeniería genética usando proteínas de tipo anticuerpo como armazón de CDR. Dichas proteínas de unión a antígeno modificadas por ingeniería genética están dentro del alcance de la divulgación.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento pueden tener una cadena pesada murina. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento tienen una cadena ligera murina. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos pueden tener una cadena pesada y una ligera, en donde la cadena pesada es una cadena pesada murina y la cadena ligera es una cadena ligera murina. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento tienen una cadena pesada de IgG1 murina. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento tienen una cadena ligera de Ig kappa murina. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos pueden tener una cadena pesada y una ligera, en donde la cadena pesada es una cadena pesada de IgG1 murina y la cadena ligera es una cadena de Ig kappa murina.

Polinucleótidos que codifican los anticuerpos

También se describen polinucleótidos que codifican anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que se unen preferentemente con un derivado de vitamina D, tal como 25-hidroxitamina D2 y/o 25-hidroxitamina D3, o un análogo de 25-hidroxitamina D, tal como una molécula inmunogénica o compuesto de vitamina D-C22. Los polinucleótidos descritos pueden aparecer en una diversidad de formas y, por lo tanto, pueden ser polinucleótidos nativos, polinucleótidos recombinantes (tales como ADNc) o polinucleótidos producidos de forma sintética. En algunas realizaciones, los polinucleótidos codifican un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una secuencia de CDR1 de cadena pesada sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 10, por ejemplo la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, los polinucleótidos codifican un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una CDR2 de cadena pesada sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 11, por ejemplo

5 sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 26, por ejemplo la SEQ ID NO: 18; una CDR2 de cadena ligera sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 27, por ejemplo la SEQ ID NO: 19; y una CDR3 de cadena ligera sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 28, por ejemplo la SEQ ID NO: 20; una FWR1 de cadena ligera sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 29, por ejemplo la SEQ ID NO: 21; una FWR2 de cadena ligera sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 30, por ejemplo la SEQ ID NO: 22; y una FWR3 de cadena ligera sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 31, por ejemplo la SEQ ID NO: 23.

10 En el presente documento, se describen los polinucleótidos que codifican un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una cadena pesada y una ligera, en donde los polinucleótidos codifican una CDR1 de cadena pesada sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 10, por ejemplo la SEQ ID NO: 2; una CDR2 de cadena pesada sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 11, por ejemplo la SEQ ID NO: 3; una CDR3 de cadena pesada sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 12, por ejemplo la SEQ ID NO: 4; una FWR1 de cadena pesada sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 13, por ejemplo la SEQ ID NO: 5; una FWR2 de cadena pesada sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 14, por ejemplo la SEQ ID NO: 6; y una FWR3 de cadena pesada sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 15, por ejemplo la SEQ ID NO: 7; y una CDR1 de cadena ligera sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 26, por ejemplo la SEQ ID NO: 18; una CDR2 de cadena ligera sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 27, por ejemplo la SEQ ID NO: 19; una CDR3 de cadena ligera sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 28, por ejemplo la SEQ ID NO: 20; una FWR1 de cadena ligera sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 29, por ejemplo la SEQ ID NO: 21; una FWR2 de cadena ligera sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 30, por ejemplo la SEQ ID NO: 22; y una FWR3 de cadena ligera sustancialmente igual que, o idéntica a, la SEQ ID NO: 31, por ejemplo la SEQ ID NO: 23.

Los polinucleótidos que codifican proteínas de unión a antígeno modificadas por ingeniería genética están dentro del alcance de la divulgación.

25 En algunas realizaciones, los polinucleótidos descritos (y los péptidos que codifican) incluyen una secuencia líder. Se puede emplear cualquier secuencia líder conocida en la técnica. En algunas realizaciones, la secuencia líder puede ser, o basarse en, la secuencia líder de cadena pesada o ligera de un anticuerpo. La secuencia líder puede incluir, pero sin limitación, un sitio de restricción o un sitio de inicio de la traducción.

30 Debido a la variación de secuencia natural que probablemente exista entre cadenas pesadas y ligeras y los genes que los codifican, se esperaría encontrar algún nivel de variación en las secuencias de aminoácidos o los genes que codifican los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento, con poca o ninguna influencia sobre sus propiedades unión únicas (por ejemplo, especificidad y afinidad). Dicha expectativa se debe en parte a la degeneración del código genético, así como al éxito evolutivo de variaciones de secuencias de aminoácidos, que no alteran de forma apreciable la naturaleza de la proteína. En consecuencia, algunas realizaciones incluyen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que tienen 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de homología con los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno en el presente documento. Otras realizaciones incluyen anticuerpos que se unen preferentemente con un derivado de vitamina D, tal como 25-hidroxivitamina D2 y/o 25-hidroxivitamina D3, o un análogo de 25-hidroxivitamina D, tal como una molécula inmunogénica o compuesto de vitamina D-C22, o fragmentos de unión a antígeno de dichos anticuerpos, que tienen regiones marco conservadas, de almacén u otras que no se unen que no comparten homología significativa con los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento, pero sí incorporan una o más CDR u otras secuencias necesarias para conferir unión que son 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % homólogas de dichas secuencias descritas en el presente documento.

45 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento incluyen variantes que tienen sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos individuales o múltiples que conservan las propiedades biológicas (por ejemplo, afinidad de unión o preferencia de unión) de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos. El experto en la materia puede producir variantes que tienen sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos individuales o múltiples. Estas variantes pueden incluir: (a) variantes en las que uno o más restos de aminoácidos se sustituyen con aminoácidos conservativos o no conservativos, (b) variantes en las que uno o más aminoácidos se añaden a o se suprimen del polipéptido, (c) variantes en las que uno o más aminoácidos incluyen un grupo sustituyente y (d) variantes en las que el polipéptido se fusiona con otro péptido o polipéptido tal como un compañero de fusión, un marcador proteico u otro resto químico, que puede conferir propiedades útiles al polipéptido, tales como, por ejemplo, un epítipo para un anticuerpo, una secuencia de polihistidina, un resto de biotina y similares. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento pueden incluir variantes en las que restos de aminoácidos de una especie sustituyen el resto correspondiente en otra especie, en posiciones conservadas o no conservadas. En otras realizaciones, los restos de aminoácidos en posiciones no conservadas se sustituyen con restos conservativos o no conservativos. Las técnicas para obtener estas variantes, incluyendo técnicas genéticas (supresiones, deleciones, mutaciones, etc.), químicas y enzimáticas, son conocidas por el experto habitual en la materia.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento pueden representar varios

isotipos de anticuerpos, tales como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. La especificidad de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se determina en gran medida por la secuencia de aminoácidos, y la disposición, de las CDR. Por lo tanto, las CDR de un isotipo pueden transferirse a otro isotipo sin alterar la especificidad antigénica. Como alternativa, se han establecido técnicas que provocan que los hibridomas cambien de producción de un isotipo de anticuerpo a otro (cambio de isotipo) sin alterar la especificidad antigénica. En consecuencia, dichos isotipos de anticuerpo están dentro del alcance de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento tienen afinidades de unión (en M) por un derivado de vitamina D, tal como 25-hidroxitamina D2 y/o 25-hidroxitamina D3, o un análogo de 25-hidroxitamina D, tal como una molécula inmunogénica o compuesto de vitamina D-C22 que incluye una constante de disociación (K_D) de menos de 1×10^{-2} . En algunas realizaciones, la K_D es menor de 1×10^{-3} . En otras realizaciones, la K_D es menor de 1×10^{-4} . En algunas realizaciones, la K_D es menor de 1×10^{-5} . En otras realizaciones más, la K_D es menor de 1×10^{-6} , 2×10^{-6} , 3×10^{-6} , 4×10^{-6} , 5×10^{-6} , 6×10^{-6} , 7×10^{-6} , 8×10^{-6} , o 9×10^{-6} . En otras realizaciones, la K_D es menor de 1×10^{-7} , 2×10^{-7} , o 3×10^{-7} 2×10^{-7} 3×10^{-7} , 4×10^{-7} , 5×10^{-7} 6×10^{-7} , 7×10^{-7} 8×10^{-7} , o 9×10^{-7} . En otras realizaciones, la K_D es menor de 1×10^{-8} , 2×10^{-8} , 3×10^{-8} , 4×10^{-8} , 5×10^{-8} , 6×10^{-8} , 7×10^{-8} , 8×10^{-8} , o 9×10^{-8} . En otras realizaciones, la K_D es menor de 1×10^{-9} , 2×10^{-9} , 3×10^{-9} , 4×10^{-9} , 5×10^{-9} , 6×10^{-9} , 7×10^{-9} , 8×10^{-9} , o 9×10^{-9} . En otras realizaciones, la K_D es menor de 1×10^{-10} , 2×10^{-10} , 3×10^{-10} , 2×10^{-10} 3×10^{-10} , 4×10^{-10} 5×10^{-10} 6×10^{-10} , 7×10^{-10} 8×10^{-10} , o 9×10^{-10} . En otras realizaciones más, la K_D es menor de 1×10^{-11} , 2×10^{-11} , 3×10^{-11} , 4×10^{-11} , 5×10^{-11} , 6×10^{-11} , 7×10^{-11} , 8×10^{-11} , o 9×10^{-11} . En algunas realizaciones, la K_D es menor de 1×10^{-12} . En otras realizaciones, la K_D es menor de 1×10^{-13} . En otras realizaciones, la K_D es menor de 1×10^{-14} . En otras realizaciones más, la K_D es menor de 1×10^{-15} .

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento, en algunas realizaciones, tienen reconocimiento equimolar de 25-hidroxitamina D2 y 25-hidroxitamina D3.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento pueden modificarse, por ejemplo, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de modo que la unión covalente no evite que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se una con su epítipo. Los ejemplos de modificaciones adecuadas incluyen, pero sin limitación glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación y similares. En algunas realizaciones los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden en sí mismos derivatizarse mediante grupos de protección/bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otras proteínas, y similares. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden tener restos postraduccionales que mejoran la actividad o estabilidad de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno. Estos restos incluyen azufre, metilo, hidrato de carbono, fósforo así como otros grupos químicos hallados habitualmente en moléculas de inmunoglobulina. Asimismo, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden contener uno o más aminoácidos no convencionales.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento pueden marcarse o conjugarse con marcadores de diagnóstico.

También se proporcionan vectores que comprenden los polinucleótidos descritos en el presente documento. Los vectores pueden ser vectores de expresión. Se proporcionan por lo tanto vectores de expresión recombinante que contienen una secuencia que codifica un polipéptido de interés. El vector de expresión puede contener una o más secuencias adicionales tales como, pero sin limitación, secuencias reguladoras (por ejemplo, promotor, potenciador), un marcador de selección y una señal de poliadenilación. En algunas realizaciones, los vectores pueden codificar el segmento de cadena pesada de un anticuerpo o proteína de unión a antígeno descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, los vectores pueden codificar el segmento de cadena ligera de un anticuerpo o proteína de unión a antígeno descrito en el presente documento. En algunos casos los componentes de cadena pesada y ligera pueden estar codificados por un único vector. En otras realizaciones, los componentes de cadena pesada y ligera pueden estar codificados por diferentes vectores. Se conocen bien vectores para transformar una amplia diversidad de células hospedadoras e incluyen, pero sin limitación, plásmidos, fagémidos, cósmidos, baculovirus, bácmidos, cromosomas artificiales de bacterias (BAC), cromosomas artificiales de levaduras (YAC), así como otros vectores bacterianos, de levadura y víricos.

Los vectores de expresión recombinantes en el alcance de la descripción incluyen fragmentos de ácido nucleico sintéticos, genómicos o procedentes de ADNc que codifican al menos una proteína recombinante que puede unirse operativamente con elementos reguladores adecuados. Dichos elementos reguladores pueden incluir un promotor de la transcripción, secuencias que codifican sitios de unión al ribosoma de ARNm adecuados y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. Los vectores de expresión, especialmente vectores de expresión de mamíferos, también pueden incluir uno o más elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor adecuado y potenciador ligado al gen para expresar, otras secuencias no transcritas flanqueantes 5' o 3', secuencias no traducidas 5' o 3' (tales como sitios de unión a ribosomas necesarios), un sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de corte y empalme o secuencias de terminación de la transcripción. También puede incorporarse un origen de replicación que confiere la capacidad de replicar en un hospedador.

Las secuencias de control de la transcripción y la traducción en vectores de expresión para usar en la transformación de células de vertebrados pueden ser proporcionadas por fuentes víricas. Los vectores ejemplares pueden construirse como se describe en Okayama y Berg, 3 Mol. Cell. Biol. 280 (1983).

5 En algunas realizaciones, la secuencia codificante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se coloca bajo el control de un promotor constitutivo potente, tal como los promotores para los siguientes genes: hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT), adenosina desaminasa, piruvato quinasa, beta-actina, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana y otros. Además, muchos promotores víricos actúan de forma constitutiva en células eucariotas y son adecuados para su uso con las realizaciones descritas. Dichos promotores víricos incluyen, sin limitación, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), los promotores tempranos y tardíos de SV40, 10 el promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV), las repeticiones terminales largas (LTR) del virus de leucemia de Moloney, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus Epstein-Barr (VEB), el virus del sarcoma de Rous (VSR) y otros retrovirus, y el promotor de timidina quinasa del virus del herpes simple. En una realización, la secuencia codificante del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se coloca bajo el control de un promotor inducible tal como el promotor de metalotioneína, promotor inducible por tetraciclina, promotor inducible por doxiciclina, 15 promotores que contienen uno o más elementos de respuesta estimulados por interferón (ISRE) tales como proteína quinasa R 2',5'-oligoadenilato sintetasas, genes de Mx, ADAR1 y similares.

Los vectores descritos en el presente documento pueden contener uno o más sitios de entrada de ribosomas internos (IRES). La inclusión de una secuencia de IRES en vectores de fusión puede ser beneficiosa para potenciar la expresión de algunas proteínas. En algunas realizaciones el sistema de vector incluirá uno o más sitios de poliadenilación (por 20 ejemplo, SV40), que pueden estar cadena arriba o cadena abajo de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico anteriormente mencionadas. Los componentes de vectores pueden ligarse de forma contigua o disponerse de una manera que proporcione separación óptima para expresar los productos génicos (es decir, mediante la introducción de nucleótidos "espaciadores" entre las ORF) o situarse de otra manera. Los elementos reguladores, tales como el motivo IRES, también pueden disponerse para proporcionar separación óptima para la expresión.

25 Los vectores pueden comprender marcadores de selección, que son bien conocidos en la técnica. Los marcadores de selección incluyen marcadores de selección positivos y negativos, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos (por ejemplo, gen de resistencia a neomicina, un gen de resistencia a higromicina, un gen de resistencia a kanamicina, un gen de resistencia a tetraciclina, un gen de resistencia a penicilina), genes de glutamato sintasa, HSV-TK, derivados de HSV-TK para selección de ganciclovir, o gen de nucleósido de purina fosforilasa bacteriana para selección de 6-metilpurina (Gadi *et al.*, 7 Gene Ther. 1738-1743 (2000)). Una secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador de selección o el sitio de clonación puede estar cadena arriba o cadena abajo de una secuencia de ácido nucleico que 30 codifica un polipéptido de interés o sitio de clonación.

Los vectores descritos en el presente documento pueden usarse para transformar diversas células con los genes que codifican los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos. Por ejemplo, los vectores pueden usarse para 35 generar células productoras de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Por lo tanto, otro aspecto presenta células hospedadoras transformadas con vectores que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une con un derivado de vitamina D, tal como 25-hidroxivitamina D2 y/o 25-hidroxivitamina D3, o un análogo de 25-hidroxivitamina D, tal como una molécula inmunogénica o compuesto de vitamina D-C22 tales como los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos 40 y ejemplificados en el presente documento.

Se conocen en este campo numerosas técnicas para la introducción de genes ajenos en células y pueden usarse para construir las células recombinantes con el fin de llevar a cabo los métodos descritos, de acuerdo con las diversas realizaciones descritas y ejemplificadas en el presente documento. La técnica usada debería proporcionar la 45 transferencia estable de la secuencia génica heteróloga a la célula hospedadora, de modo que la secuencia génica heteróloga sea heredable y expresable por la descendencia celular y de modo que el desarrollo y las funciones fisiológicas necesarios de las células receptoras no se alteren. Las técnicas que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, transferencia cromosómica (por ejemplo, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas), métodos físicos (por ejemplo, transfección, fusión de esferoplastos, microinyección, electroporación, vehículo liposómico), transferencia de vector vírico (por ejemplo, virus de ADN 50 recombinante, virus de ARN recombinante) y similares (descritos en Cline, 29 Pharmac. Ther. 69-92 (1985)). También puede usarse precipitación con fosfato cálcico y fusión inducida por polietilenglicol (PEG) de protoplastos bacterianos con células de mamífero para transformar células.

Las células adecuadas para su uso en la expresión de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento son preferentemente células eucariotas, más preferentemente células de origen vegetal, de 55 roedor o humano, por ejemplo, pero sin limitación, NSO, CHO, perC.6, Tk-ts13, BHK, células HEK293, COS-7, T98G, CV-1/EBNA, células L, C127, 3T3, HeLa, NS1, células de mieloma Sp2/0 y líneas celulares BHK, entre otras. Además, puede conseguirse expresión de anticuerpos usando células de hibridoma. Los métodos para producir hibridomas están bien establecidos en la técnica.

- Las células transformadas con vectores de expresión descritos en el presente documento pueden seleccionarse o explorarse para determinar la expresión recombinante de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento. Las células positivas para recombinantes se expanden y exploran para determinar subclones que muestran un fenotipo deseado, tal como un nivel alto de expresión, propiedades de crecimiento potenciadas o la capacidad para producir proteínas con características bioquímicas deseadas, por ejemplo, debido a la modificación de proteínas o modificaciones postraduccionales alteradas. Estos fenotipos pueden deberse a propiedades inherentes de un subclón dado o a mutación. Pueden efectuarse mutaciones mediante el uso de productos químicos, luz de longitud de onda UV, radiación, virus, mutágenos de inserción, inhibición de la reparación de desapareamiento de ADN o una combinación de dichos métodos.
- Una vez que se ha identificado una célula que expresa la proteína deseada, esta puede expandirse y seleccionarse. Las células transformadas pueden seleccionarse de varias formas. Por ejemplo, las células pueden seleccionarse para expresión del polipéptido de interés. Las células transformadas con un vector que contiene un marcador seleccionable, tal como producción de proteína fluorescente, puede seleccionarse positivamente para expresión del marcador. En otras realizaciones, las células que contienen un vector con un gen de resistencia a fármacos pueden seleccionarse positivamente para la capacidad de crecer en condiciones selectivas.

Ensayos y métodos

- Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento pueden usarse para detectar derivados o análogos de vitamina D en una muestra. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno se usan para detectar un derivado de vitamina D, tal como 25-hidroxivitamina D₂ y/o 25-hidroxivitamina D₃, o un análogo de 25-hidroxivitamina D, tal como una molécula inmunogénica o compuesto de vitamina D-C22. En algunas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno descritos pueden usarse para detectar derivados o análogos de vitamina D en una muestra biológica obtenida de un paciente o un sujeto. En algunas realizaciones, la muestra puede ser sangre o un componente sanguíneo, tal como suero. En realizaciones preferidas, el individuo o sujeto es un ser humano. En algunos aspectos la muestra biológica puede obtenerse de un paciente o sujeto humano, por ejemplo, sangre humana. Los métodos descritos pueden usarse con los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno solamente o junto con otros anticuerpos o reactivos de detección fácilmente disponibles.

- Se proporcionan en el presente documento métodos para detectar deficiencia en vitamina D en un sujeto. En realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano. Los métodos comprenden determinar el nivel de 25-hidroxivitamina D total en una muestra biológica procedente del sujeto en donde una reducción o disminución del nivel en la muestra biológica en relación con el nivel en una muestra de control o con un nivel umbral de 30 ng/ml es indicativa de una deficiencia en vitamina D en el sujeto.

- 25-hidroxivitamina D puede estar en una de dos formas, 25-hidroxivitamina D₂ y 25-hidroxivitamina D₃. En realizaciones preferidas de los métodos para detectar deficiencia en vitamina D en un sujeto, el nivel de 25-hidroxivitamina D₂ y 25-hidroxivitamina D₃ se determina poniendo en contacto la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconoce tanto 25-hidroxivitamina D₂ como 25-hidroxivitamina D₃.

Pueden emplearse diversos protocolos heterogéneos y homogéneos, bien competitivos o bien no competitivos, para realizar los métodos para detectar deficiencia en vitamina D en un sujeto. En realizaciones preferidas, los métodos se realizan mediante inmunoensayo competitivo secuencial. El Centaur™, Vista™ e Immulite™ son sistemas de ensayo que pueden usarse para realizar un inmunoensayo competitivo.

- De acuerdo con los métodos para detectar deficiencia en vitamina D en un sujeto, el nivel de 25-hidroxivitamina D₂ y 25-hidroxivitamina D₃ total en una muestra biológica puede detectarse mediante quimioluminiscencia potenciada (ECL), inmunoensayo enzimático (EIA), inmunohistoquímica (IHC), análisis de transferencia de Western, radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, diálisis en equilibrio, inmunodiferenciación o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

- En realizaciones preferidas de los métodos para detectar deficiencia en vitamina D en un sujeto, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno usado de acuerdo con los métodos no tiene reacción cruzada con vitamina D₂ y/o vitamina D₃. En realizaciones preferidas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una CDR1 de Lc de la SEQ ID NO: 26, una CDR2 de Lc de la SEQ ID NO: 27 y una CDR3 de Lc de la SEQ ID NO: 28, una CDR1 de Hc de la SEQ ID NO: 10, una CDR2 de Hc de la SEQ ID NO: 11 y una CDR3 de Hc de la SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene la propiedad de reconocimiento equimolar para 25-hidroxivitamina D₂ y 25-hidroxivitamina D₃. El anticuerpo según la presente invención es el anticuerpo monoclonal 10H9.

- Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que reconocen 25-hidroxivitamina D₂ y 25-hidroxivitamina D₃ que pueden usarse en los métodos para detectar deficiencia en vitamina D en un sujeto pueden marcarse, por ejemplo,

con un marcador detectable. Los marcadores ejemplares incluyen, pero sin limitación, compuestos quimioluminiscentes (por ejemplo, un compuesto de éster de acridinio), un compuesto fosforescente, un compuesto fluorescente, un radiomarcador, biotina o una enzima. Los marcadores ejemplares mencionados pueden habitualmente detectarse solo cuando se excitan mediante métodos que incluyen, pero sin limitación, la adición de diferentes productos químicos, estimulación por luz o exposición a sustrato u otros compuestos. Cuando se usa un compuesto de éster de acridinio, la quimioluminiscencia es desencadenada por peróxido y ácido/base lo que da como resultado un destello que puede leerse mediante instrumentación apropiada. Puede usarse una etapa de lavado opcional antes de iniciar la capacidad de detección del marcador detectable.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede inmovilizarse en un soporte de fase sólida.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede conjugarse con una proteína transportadora. El complejo entre el anticuerpo o la proteína de unión a antígeno y proteína transportadora también puede inmovilizarse en un soporte de fase sólida.

Los soportes de fase sólida para su uso en los métodos para detectar deficiencia en vitamina D en un sujeto incluyen partículas paramagnéticas; dextrano reticulado disponible con la marca comercial SEPHADEX (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N.J.); agarosa; perlas de poliestireno; cloruro de polivinilo, poliestireno, poliacrilamida reticulada, redes a base de nitrocelulosa o nailon tales como láminas, tiras o palas; o tubos, placas o los pocillos de una placa de microtitulación tales como las hechas de poliestireno o polivinilcloruro. Cuando se usan partículas paramagnéticas, puede usarse alguna fuente de un campo magnético para retener las partículas y moléculas unidas directa o indirectamente a las partículas durante una etapa de lavado opcional. Las moléculas pueden unirse covalentemente, mediante enlaces salinos, enlaces de hidrógeno u otro tipo de enlace.

La muestra biológica puede ser sangre, suero sanguíneo o plasma sanguíneo. En algunas realizaciones, La muestra biológica puede almacenarse en condiciones biológicas durante hasta 24 horas antes de su uso en los métodos descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones de los métodos para detectar deficiencia en vitamina D en un sujeto, la muestra biológica se trata o combina con sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS) antes de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconoce tanto 25-hidroxivitamina D2 como 25-hidroxivitamina D3. Como alternativa, la muestra biológica se puede tratar o combinar con sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS) simultáneamente con la puesta en contacto de la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconoce tanto 25-hidroxivitamina D2 como 25-hidroxivitamina D3. El ANS puede estar en forma de un ácido o una sal de ANS (por ejemplo, sal de sodio de ANS, sal de potasio de ANS, sal de magnesio de ANS o sal de amonio de ANS). El ANS puede estar presente, por ejemplo, en un tampón de desplazamiento. Puede usarse opcionalmente metanol con el sulfonato de 8-amino-1-naftaleno (ANS) antes de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o simultáneamente con la puesta en contacto de la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Puede incluirse metanol, por ejemplo, en el tampón de desplazamiento.

En algunas realizaciones de los métodos para detectar deficiencia en vitamina D en un sujeto, la muestra biológica también se trata o combina con sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS) y etilenglicol antes de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo que reconoce tanto 25-hidroxivitamina D2 como 25-hidroxivitamina D3 o fragmento de unión a antígeno. Como alternativa, la muestra biológica se puede tratar o combinar con sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS) y etilenglicol simultáneamente con la puesta en contacto de la muestra biológica con un anticuerpo que reconoce tanto 25-hidroxivitamina D2 como 25-hidroxivitamina D3 o fragmento de unión a antígeno. El ANS puede estar en forma de un ácido o una sal de ANS (por ejemplo, sal de sodio de ANS, sal de potasio de ANS, sal de magnesio de ANS o sal de amonio de ANS). El ANS y etilenglicol pueden estar presentes en un tampón de desplazamiento. Puede usarse opcionalmente metanol con el sulfonato de 8-amino-1-naftaleno (ANS) y etilenglicol antes de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o simultáneamente con la puesta en contacto de la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Puede incluirse metanol, por ejemplo, en el tampón de desplazamiento.

En algunas realizaciones de los métodos para detectar deficiencia en vitamina D en un sujeto, se añade un análogo de 25-hidroxivitamina D a la muestra biológica después de la etapa de contacto. El análogo de 25-hidroxivitamina D puede marcarse. El análogo de 25-hidroxivitamina D o análogo de 25-hidroxivitamina D marcado puede estar presente también en un tampón de estabilización que comprende sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS). El ANS puede estar en forma de un ácido o una sal de ANS (por ejemplo, sal de sodio de ANS, sal de potasio de ANS, sal de magnesio de ANS o sal de amonio de ANS).

Los análogos de vitamina D descritos en el presente documento se pueden basar en el uso de un derivado de vitamina D de carbono 22 (vitamina D-C22), que incluye un grupo carboxilo C22 cuando no está conjugado, como se representa en la Figura 1(a) (Hollis *et al.*, Clin. Chem. 39(3):529-33 (1993)). En algunas realizaciones, el análogo de vitamina D puede ser vitamina D-C22. En algunas realizaciones, el análogo de vitamina D puede estar conjugado con una proteína

transportadora.

5 En algunas realizaciones de los métodos para detectar deficiencia en vitamina D en un sujeto, los análogos de vitamina D descritos pueden fijarse directamente al vehículo proteico. Por ejemplo, la vitamina D-C22 puede conjugarse directamente con albúmina de suero bovino (BSA). El número de análogos de vitamina D que puede conjugarse con un vehículo proteico dado variará basándose en el vehículo usado. Los expertos en la materia entenderán que puede usarse una amplia diversidad de proteínas transportadoras para los fines descritos en el presente documento. Algunos vehículos adecuados incluyen, KLH, KLH PEGilada, hemocianina de *Concholepas concholepas* (CCH), BSA cationizada y ovoalbúmina, por nombrar solo algunos.

10 La conjugación de proteína transportadora con el análogo de vitamina D puede producirse mediante el uso de un conector químico. El conector químico puede estar compuesto por alquilo, arilo, alquiloxi, amida, sulfonamida o carbonilo o grupos peptídicos. La conjugación del análogo de vitamina D o derivado de vitamina D con la proteína puede realizarse mediante reacción entre grupos amino de la proteína y un grupo de éster de N-hidroxisuccinimida (éster de NHS) reactivo del análogo de vitamina D o derivado de vitamina D.

15 En algunas realizaciones de los métodos para detectar deficiencia en vitamina D en un sujeto, los niveles de vitamina D pueden detectarse en 20 minutos o menos partiendo del punto en el que la muestra biológica se combina con el tampón de desplazamiento.

20 La deficiencia en vitamina D en el sujeto puede ser indicativa de o asociada con una enfermedad. Las enfermedades asociadas con deficiencia en vitamina D pueden incluir: raquitismo, osteomalacia, tensión arterial alta, osteoporosis, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad cardiovascular, esquizofrenia, depresión, enfermedades del sistema nervioso, diabetes, enfermedad infecciosa, asma, alergia o cáncer.

25 También se proporcionan en el presente documento métodos para tratar a un sujeto que se sospecha que tiene una deficiencia en vitamina D determinando el nivel de 25-hidroxivitamina D total en una muestra biológica procedente del sujeto y, si se determina una reducción entre el nivel en la muestra biológica en relación con el nivel en un control normal o un nivel umbral de 30 ng/ml, administrar al sujeto un tratamiento para deficiencia en vitamina D. En realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano. Hay varias formas adecuadas para tratar una deficiencia en vitamina D. La deficiencia en vitamina D puede tratarse complementando el consumo de vitamina D o mediante fototerapia. La fototerapia puede incluir exposición aumentada a luz del sol natural o exposición a fuentes artificiales de luz ultravioleta B.

30 En realizaciones preferidas de los métodos para tratar a un sujeto que se sospecha que tiene una deficiencia en vitamina D, el nivel de 25-hidroxivitamina D2 y 25-hidroxivitamina D3 se determina poniendo en contacto la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconoce tanto 25-hidroxivitamina D2 como 25-hidroxivitamina D3.

35 Diversos protocolos heterogéneos y homogéneos, competitivos o no competitivos, pueden emplearse para realizar los métodos para tratar a un sujeto que se sospecha que tiene una deficiencia en vitamina D. En realizaciones preferidas, los métodos se realizan mediante inmunoensayo competitivo secuencial. El Centaur™, Vista™ e Immulite™ son sistemas de ensayo que pueden usarse para realizar un inmunoensayo competitivo.

40 De acuerdo con los métodos para tratar a un sujeto que se sospecha que tiene una deficiencia en vitamina D, el nivel de 25-hidroxivitamina D2 y 25-hidroxivitamina D3 total en una muestra biológica puede detectarse mediante quimioluminiscencia potenciada (ECL), inmunoensayo enzimático (EIA), inmunohistoquímica (IHC), análisis de transferencia de Western, radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, diálisis en equilibrio, inmunodiferenciación o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

45 En realizaciones preferidas de los métodos para tratar a un sujeto que se sospecha que tiene una deficiencia en vitamina D, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno usado de acuerdo con los métodos no tiene reacción cruzada con vitamina D2 y/o vitamina D3. En realizaciones preferidas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una CDR1 de Lc de la SEQ ID NO: 26, una CDR2 de Lc de la SEQ ID NO: 27 y una CDR3 de Lc de la SEQ ID NO: 28, una CDR1 de Hc de la SEQ ID NO: 10, una CDR2 de Hc de la SEQ ID NO: 11 y una CDR3 de Hc de la SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene la propiedad de reconocimiento equimolar para 25-hidroxivitamina D2 y 25-hidroxivitamina D3. El anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 10H9.

50 Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que reconocen 25-hidroxivitamina D2 y 25-hidroxivitamina D3 que pueden usarse en los métodos para tratar a un sujeto que se sospecha que tiene una deficiencia en vitamina D pueden marcarse, por ejemplo, con un marcador detectable. Los marcadores ejemplares incluyen, pero sin limitación, compuestos quimioluminiscentes (por ejemplo, un compuesto de éster de acridinio), un compuesto fosforescente, un

compuesto fluorescente, un radiomarcador, biotina o una enzima. Los marcadores ejemplares mencionados pueden habitualmente detectarse solo cuando se excitan mediante métodos que incluyen, pero sin limitación, la adición de diferentes productos químicos, estimulación por luz o exposición a sustrato u otros compuestos. Cuando se usa compuesto de éster de acridinio, la quimioluminiscencia es desencadenada por peróxido y ácido/base lo que da como resultado un destello que puede leerse mediante instrumentación apropiada. Puede usarse una etapa de lavado opcional antes de iniciar la capacidad de detección del marcador detectable.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede inmovilizarse en un soporte de fase sólida.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede conjugarse con una proteína transportadora. El complejo entre el anticuerpo o la proteína de unión a antígeno y proteína transportadora también puede inmovilizarse en un soporte de fase sólida.

Los soportes de fase sólida para su uso en los métodos descritos en el presente documento incluyen partículas paramagnéticas; dextrano reticulado disponible con la marca comercial SEPHADEX (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N.J.); agarosa; perlas de poliestireno; cloruro de polivinilo, poliestireno, poliácridamida reticulada, redes a base de nitrocelulosa o nailon tales como láminas, tiras o palas; o tubos, placas o los pocillos de una placa de microtitulación tales como las hechas de poliestireno o polivinilcloruro. Cuando se usan partículas paramagnéticas, puede usarse alguna fuente de un campo magnético para retener las partículas y moléculas unidas directa o indirectamente a las partículas durante una etapa de lavado opcional. Las moléculas pueden unirse covalentemente, mediante enlaces salinos, enlaces de hidrógeno u otro tipo de enlace.

La muestra biológica puede ser sangre, suero sanguíneo o plasma sanguíneo. En algunas realizaciones, La muestra biológica puede almacenarse en condiciones biológicas durante hasta 24 horas antes de su uso en los métodos descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones de los métodos para tratar a un sujeto que se sospecha que tiene una deficiencia en vitamina D, la muestra biológica se trata o combina con sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS) antes de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconoce tanto 25-hidroxivitamina D2 como 25-hidroxivitamina D3. Como alternativa, la muestra biológica se puede tratar o combinar con sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS) simultáneamente con la puesta en contacto de la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconoce tanto 25-hidroxivitamina D2 como 25-hidroxivitamina D3. El ANS puede estar en forma de un ácido o una sal de ANS (por ejemplo, sal de sodio de ANS, sal de potasio de ANS, sal de magnesio de ANS o sal de amonio de ANS). El ANS puede estar presente, por ejemplo, en un tampón de desplazamiento. Puede usarse opcionalmente metanol con el sulfonato de 8-amino-1-naftaleno (ANS) antes de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o simultáneamente con la puesta en contacto de la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Puede incluirse metanol, por ejemplo, en el tampón de desplazamiento.

En algunas realizaciones de los métodos para tratar a un sujeto que se sospecha que tiene una deficiencia en vitamina D, la muestra biológica también se trata o combina con sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS) y etilenglicol antes de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo que reconoce tanto 25-hidroxivitamina D2 como 25-hidroxivitamina D3 o fragmento de unión a antígeno. Como alternativa, la muestra biológica se puede tratar o combinar con sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS) y etilenglicol simultáneamente con la puesta en contacto de la muestra biológica con un anticuerpo que reconoce tanto 25-hidroxivitamina D2 como 25-hidroxivitamina D3 o fragmento de unión a antígeno. El ANS puede estar en forma de un ácido o una sal de ANS (por ejemplo, sal de sodio de ANS, sal de potasio de ANS, sal de magnesio de ANS o sal de amonio de ANS). El ANS y etilenglicol pueden estar presentes en un tampón de desplazamiento. Puede usarse opcionalmente metanol con el sulfonato de 8-amino-1-naftaleno (ANS) y etilenglicol antes de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o simultáneamente con la puesta en contacto de la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Puede incluirse metanol, por ejemplo, en el tampón de desplazamiento.

En algunas realizaciones de los métodos para tratar a un sujeto que se sospecha que tiene una deficiencia en vitamina D, se añade un análogo de 25-hidroxivitamina D a la muestra biológica después de la etapa de contacto. El análogo de 25-hidroxivitamina D puede marcarse. El análogo de 25-hidroxivitamina D o análogo de 25-hidroxivitamina D marcado puede estar presente también en un tampón de estabilización que comprende sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS). El ANS puede estar en forma de un ácido o una sal de ANS (por ejemplo, sal de sodio de ANS, sal de potasio de ANS, sal de magnesio de ANS o sal de amonio de ANS).

Los análogos de vitamina D descritos en el presente documento se pueden basar en el uso de un derivado de vitamina D de carbono 22 (vitamina D-C22), que incluye un grupo carboxilo C22 cuando no está conjugado, como se representa en la Figura 1(a) (Hollis *et al.*, Clin. Chem. 39(3):529-33 (1993)). En algunas realizaciones, el análogo de vitamina D puede ser vitamina D-C22. En algunas realizaciones, el análogo de vitamina D puede estar conjugado con una proteína transportadora.

5 En algunas realizaciones de los métodos para tratar a un sujeto que se sospecha que tiene una deficiencia en vitamina D, los análogos de vitamina D descritos pueden fijarse directamente al vehículo proteico. Por ejemplo, la vitamina D-C22 puede conjugarse directamente con albúmina de suero bovino (BSA). El número de análogos de vitamina D que puede conjugarse con un vehículo proteico dado variará basándose en el vehículo usado. Los expertos en la materia entenderán que puede usarse una amplia diversidad de proteínas transportadoras para los fines descritos en el presente documento. Algunos vehículos adecuados incluyen, KLH, KLH PEGilada, hemocianina de *Concholepas concholepas* (CCH), BSA cationizada y ovoalbúmina, por nombrar solo algunos.

10 La conjugación de proteína transportadora con el análogo de vitamina D puede producirse mediante el uso de un conector químico. El conector químico puede estar compuesto por alquilo, arilo, alquiloxi, amida, sulfonamida o carbonilo o grupos peptídicos. La conjugación del análogo de vitamina D o derivado de vitamina D con la proteína puede realizarse mediante reacción entre grupos amino de la proteína y un grupo de éster de N-hidroxisuccinimida (éster de NHS) reactivo del análogo de vitamina D o derivado de vitamina D.

15 En algunas realizaciones de los métodos para tratar a un sujeto que se sospecha que tiene una deficiencia en vitamina D, los niveles de vitamina D pueden detectarse en 20 minutos o menos partiendo del punto en el que la muestra biológica se combina con el tampón de desplazamiento.

La deficiencia en vitamina D en el sujeto puede ser indicativa de o asociada con una enfermedad. Las enfermedades asociadas con deficiencia en vitamina D pueden incluir: raquitismo, osteomalacia, tensión arterial alta, osteoporosis, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad cardiovascular, esquizofrenia, depresión, enfermedades del sistema nervioso, diabetes, enfermedad infecciosa, asma, alergia o cáncer.

20 Se proporcionan además en el presente documento métodos para supervisar la progresión de deficiencia en vitamina D en un sujeto que lo necesite determinando el nivel de 25-hidroxivitamina D en una primera muestra biológica procedente del sujeto en un primer momento y determinando después el nivel de 25-hidroxivitamina D total en una segunda muestra biológica procedente del sujeto en un segundo momento posterior al primer momento en donde una reducción entre el nivel de la primera muestra biológica y el nivel en la segunda muestra biológica es indicativa de la progresión o el empeoramiento de una deficiencia en vitamina D en el sujeto, en donde poco o ningún cambio entre el nivel en la primera muestra biológica y el nivel en la segunda muestra biológica es indicativo de estabilización de una deficiencia en vitamina D en el sujeto, y en donde un aumento entre el nivel en la primera muestra biológica y el nivel en la segunda muestra biológica es indicativo de regresión de una deficiencia en vitamina D en el sujeto. En realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano.

30 En realizaciones preferidas de los métodos para supervisar la progresión de deficiencia en vitamina D en un sujeto, el nivel de 25-hidroxivitamina D2 y 25-hidroxivitamina D3 se determina poniendo en contacto la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconoce tanto 25-hidroxivitamina D2 como 25-hidroxivitamina D3.

35 Diversos protocolos heterogéneos y homogéneos, competitivos o no competitivos, pueden emplearse para realizar los métodos para supervisar la progresión de deficiencia en vitamina D en un sujeto. En realizaciones preferidas, los métodos se realizan mediante inmunoensayo competitivo. El Centaur™, Vista™ e Immulite™ son sistemas de ensayo que pueden usarse para realizar un inmunoensayo competitivo.

40 De acuerdo con los métodos para supervisar la progresión de deficiencia en vitamina D en un sujeto, el nivel de 25-hidroxivitamina D2 y 25-hidroxivitamina D3 total en una muestra biológica puede detectarse mediante quimioluminiscencia potenciada (ECL), inmunoensayo enzimático (EIA), inmunohistoquímica (IHC), análisis de transferencia de Western, radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, diálisis en equilibrio, inmunodiferenciación o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

45 En realizaciones preferidas de los métodos para supervisar la progresión de deficiencia en vitamina D en un sujeto, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno usado de acuerdo con los métodos no tiene reacción cruzada con vitamina D2 y/o vitamina D3. En realizaciones preferidas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una CDR1 de Lc de la SEQ ID NO: 26, una CDR2 de Lc de la SEQ ID NO: 27 y una CDR3 de Lc de la SEQ ID NO: 28, una CDR1 de Hc de la SEQ ID NO: 10, una CDR2 de Hc de la SEQ ID NO: 11 y una CDR3 de Hc de la SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene la propiedad de reconocimiento equimolar para 25-hidroxivitamina D2 y 25-hidroxivitamina D3. El anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 10H9.

55 Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que reconocen 25-hidroxivitamina D2 y 25-hidroxivitamina D3 que pueden usarse en estos métodos pueden marcarse, por ejemplo, con un marcador detectable. Los marcadores ejemplares incluyen, pero sin limitación, compuestos quimioluminiscentes (por ejemplo, un compuesto de éster de acridinio), un compuesto fosforescente, un compuesto fluorescente, un radiomarcador, biotina o una enzima. Los marcadores ejemplares mencionados pueden habitualmente detectarse solo cuando se excitan mediante métodos

que incluyen, pero sin limitación, la adición de diferentes productos químicos, estimulación por luz o exposición a sustrato u otros compuestos. Cuando se usa compuesto de éster de acridinio, la quimioluminiscencia es desencadenada por peróxido y ácido/base lo que da como resultado un destello que puede leerse mediante instrumentación apropiada. Puede usarse una etapa de lavado opcional antes de iniciar la capacidad de detección del marcador detectable.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede inmovilizarse en un soporte de fase sólida.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede conjugarse con una proteína transportadora. El complejo entre el anticuerpo o la proteína de unión a antígeno y proteína transportadora también puede inmovilizarse en un soporte de fase sólida.

Los soportes de fase sólida para su uso en los métodos para supervisar la progresión de deficiencia en vitamina D en un sujeto incluyen partículas paramagnéticas; dextrano reticulado disponible con la marca comercial SEPHADEX (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N.J.); agarosa; perlas de poliestireno; cloruro de polivinilo, poliestireno, poliacrilamida reticulada, redes a base de nitrocelulosa o nailon tales como láminas, tiras o palas; o tubos, placas o los pocillos de una placa de microtitulación tales como las hechas de poliestireno o polivinilcloruro. Cuando se usan partículas paramagnéticas, puede usarse alguna fuente de un campo magnético para retener las partículas y moléculas unidas directa o indirectamente a las partículas durante una etapa de lavado opcional. Las moléculas pueden unirse covalentemente, mediante enlaces salinos, enlaces de hidrógeno u otro tipo de enlace.

La muestra biológica puede ser sangre, suero sanguíneo o plasma sanguíneo. En algunas realizaciones, La muestra biológica puede almacenarse en condiciones biológicas durante hasta 24 horas antes de su uso en los métodos descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones de los métodos para supervisar la progresión de deficiencia en vitamina D en un sujeto, la muestra biológica se trata o combina con sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS) antes de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconoce tanto 25-hidroxivitamina D₂ como 25-hidroxivitamina D₃. Como alternativa, la muestra biológica se puede tratar o combinar con sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS) simultáneamente con la puesta en contacto de la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconoce tanto 25-hidroxivitamina D₂ como 25-hidroxivitamina D₃. El ANS puede estar en forma de un ácido o una sal de ANS (por ejemplo, sal de sodio de ANS, sal de potasio de ANS, sal de magnesio de ANS o sal de amonio de ANS). El ANS puede estar presente, por ejemplo, en un tampón de desplazamiento. Puede usarse opcionalmente metanol con el sulfonato de 8-amino-1-naftaleno (ANS) antes de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o simultáneamente con la puesta en contacto de la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Puede incluirse metanol, por ejemplo, en el tampón de desplazamiento.

En algunas realizaciones de los métodos para supervisar la progresión de deficiencia en vitamina D en un sujeto, la muestra biológica también se trata o combina con sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS) y etilenglicol antes de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo que reconoce tanto 25-hidroxivitamina D₂ como 25-hidroxivitamina D₃ o fragmento de unión a antígeno. Como alternativa, la muestra biológica se puede tratar o combinar con sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS) y etilenglicol simultáneamente con la puesta en contacto de la muestra biológica con un anticuerpo que reconoce tanto 25-hidroxivitamina D₂ como 25-hidroxivitamina D₃ o fragmento de unión a antígeno. El ANS puede estar en forma de un ácido o una sal de ANS (por ejemplo, sal de sodio de ANS, sal de potasio de ANS, sal de magnesio de ANS o sal de amonio de ANS). El ANS y etilenglicol pueden estar presentes en un tampón de desplazamiento. Puede usarse opcionalmente metanol con el sulfonato de 8-amino-1-naftaleno (ANS) y etilenglicol antes de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o simultáneamente con la puesta en contacto de la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Puede incluirse metanol, por ejemplo, en el tampón de desplazamiento.

En algunas realizaciones de los métodos para supervisar la progresión de deficiencia en vitamina D en un sujeto, se añade un análogo de 25-hidroxivitamina D a la muestra biológica después de la etapa de contacto. El análogo de 25-hidroxivitamina D puede marcarse. El análogo de 25-hidroxivitamina D o análogo de 25-hidroxivitamina D marcado puede estar presente también en un tampón de estabilización que comprende sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS). El ANS puede estar en forma de un ácido o una sal de ANS (por ejemplo, sal de sodio de ANS, sal de potasio de ANS, sal de magnesio de ANS o sal de amonio de ANS).

Los análogos de vitamina D descritos en el presente documento se pueden basar en el uso de un derivado de vitamina D de carbono 22 (vitamina D-C₂₂), que incluye un grupo carboxilo C₂₂ cuando no está conjugado, como se representa en la Figura 1(a) (Hollis *et al.*, Clin. Chem. 39(3):529-33 (1993)). En algunas realizaciones, el análogo de vitamina D puede ser vitamina D-C₂₂. En algunas realizaciones, el análogo de vitamina D puede estar conjugado con una proteína transportadora.

- 5 En algunas realizaciones de los métodos para supervisar la progresión de deficiencia en vitamina D en un sujeto, los análogos de vitamina D descritos pueden fijarse directamente al vehículo proteico. Por ejemplo, la vitamina D-C22 puede conjugarse directamente con albúmina de suero bovino (BSA). El número de análogos de vitamina D que puede conjugarse con un vehículo proteico dado variará basándose en el vehículo usado. Los expertos en la materia entenderán que puede usarse una amplia diversidad de proteínas transportadoras para los fines descritos en el presente documento. Algunos vehículos adecuados incluyen, KLH, KLH PEGilada, hemocianina de *Concholepas concholepas* (CCH), BSA cationizada y ovoalbúmina, por nombrar solo algunos.
- 10 La conjugación de proteína transportadora con el análogo de vitamina D puede producirse mediante el uso de un conector químico. La conjugación del análogo de vitamina D o derivado de vitamina D con la proteína puede realizarse mediante reacción entre grupos amino de la proteína y un grupo de éster de N-hidroxisuccinimida (éster de NHS) reactivo del análogo de vitamina D o derivado de vitamina D.
- 15 En algunas realizaciones de los métodos para supervisar la progresión de deficiencia en vitamina D en un sujeto, los niveles de vitamina D pueden detectarse en 20 minutos o menos partiendo del punto en el que la muestra biológica se combina con el tampón de desplazamiento.
- 20 La deficiencia en vitamina D en el sujeto puede ser indicativa de o asociada con una enfermedad. Las enfermedades asociadas con deficiencia en vitamina D pueden incluir: raquitismo, osteomalacia, tensión arterial alta, osteoporosis, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad cardiovascular, esquizofrenia, depresión, enfermedades del sistema nervioso, diabetes, enfermedad infecciosa, asma, alergia o cáncer.
- 25 También se proporcionan en el presente documento métodos para supervisar el tratamiento de la deficiencia en vitamina D en un sujeto que lo necesita determinando el nivel de 25-hidroxivitamina D total en una primera muestra biológica procedente del sujeto en un primer momento y determinando después el nivel de 25-hidroxivitamina D total en una segunda muestra biológica procedente del sujeto en un segundo momento posterior al primer momento y después del tratamiento del sujeto para dicha deficiencia en vitamina D en donde un aumento o una estabilización del nivel en la segunda muestra biológica en relación con el nivel en la primera muestra biológica es indicativo de eficacia del tratamiento de la deficiencia en vitamina D en dicho sujeto, y en donde una reducción del nivel en la segunda muestra biológica es indicativa de ineficacia del tratamiento de la deficiencia en vitamina D en dicho sujeto. En realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano.
- 30 En realizaciones preferidas de los métodos para supervisar el tratamiento de deficiencia en vitamina D en un sujeto, el nivel de 25-hidroxivitamina D2 y 25-hidroxivitamina D3 se determina poniendo en contacto la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconoce tanto 25-hidroxivitamina D2 como 25-hidroxivitamina D3.
- Diversos protocolos heterogéneos y homogéneos, competitivos o no competitivos, pueden emplearse para realizar los métodos para supervisar el tratamiento de deficiencia en vitamina D en un sujeto. En realizaciones preferidas, los métodos se realizan mediante inmunoensayo competitivo secuencial. El Centaur™, Vista™ e Immulite™ son sistemas de ensayo que pueden usarse para realizar un inmunoensayo competitivo.
- 35 De acuerdo con los métodos para supervisar el tratamiento de deficiencia en vitamina D en un sujeto, el nivel de 25-hidroxivitamina D2 y 25-hidroxivitamina D3 total en una muestra biológica puede detectarse mediante quimioluminiscencia potenciada (ECL), inmunoensayo enzimático (EIA), inmunohistoquímica (IHC), análisis de transferencia de Western, radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, diálisis en equilibrio, inmunodiferenciación o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).
- 40 En realizaciones preferidas de los métodos para supervisar el tratamiento de deficiencia en vitamina D en un sujeto, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno usado de acuerdo con los métodos no tiene reacción cruzada con vitamina D2 y/o vitamina D3. En realizaciones preferidas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una CDR1 de Lc de la SEQ ID NO: 26, una CDR2 de Lc de la SEQ ID NO: 27 y una CDR3 de Lc de la SEQ ID NO: 28, una CDR1 de Hc de la SEQ ID NO: 10, una CDR2 de Hc de la SEQ ID NO: 11 y una CDR3 de Hc de la SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene la propiedad de reconocimiento equimolar para 25-hidroxivitamina D2 y 25-hidroxivitamina D3. El anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 10H9.
- 45 Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que reconocen 25-hidroxivitamina D2 y 25-hidroxivitamina D3 que pueden usarse en los métodos para supervisar el tratamiento de deficiencia en vitamina D en un sujeto pueden marcarse, por ejemplo, con un marcador detectable. Los marcadores ejemplares incluyen, pero sin limitación, compuestos quimioluminiscentes (por ejemplo, un compuesto de éster de acridinio), un compuesto fosforescente, un compuesto fluorescente, un radiomarcador, biotina o una enzima. Los marcadores ejemplares mencionados pueden habitualmente detectarse solo cuando se excitan mediante métodos que incluyen, pero sin limitación, la adición de diferentes productos químicos, estimulación por luz o exposición a sustrato u otros compuestos. Cuando se usa
- 55

compuesto de éster de acridinio, la quimioluminiscencia es desencadenada por peróxido y ácido/base lo que da como resultado un destello que puede leerse mediante instrumentación apropiada. Puede usarse una etapa de lavado opcional antes de iniciar la capacidad de detección del marcador detectable.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede inmovilizarse en un soporte de fase sólida.

- 5 El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede conjugarse con una proteína transportadora. El complejo entre el anticuerpo o la proteína de unión a antígeno y proteína transportadora también puede inmovilizarse en un soporte de fase sólida.

10 Los soportes de fase sólida para su uso en los métodos descritos en el presente documento incluyen partículas paramagnéticas; dextrano reticulado disponible con la marca comercial SEPHADEX (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N.J.); agarosa; perlas de poliestireno; cloruro de polivinilo, poliestireno, poliácridamida reticulada, redes a base de nitrocelulosa o nailon tales como láminas, tiras o palas; o tubos, placas o los pocillos de una placa de microtitulación tales como las hechas de poliestireno o polivinilcloruro. Cuando se usan partículas paramagnéticas, puede usarse alguna fuente de un campo magnético para retener las partículas y moléculas unidas directa o indirectamente a las partículas durante una etapa de lavado opcional. Las moléculas pueden unirse covalentemente, 15 mediante enlaces salinos, enlaces de hidrógeno u otro tipo de enlace.

La muestra biológica puede ser sangre, suero sanguíneo o plasma sanguíneo. En algunas realizaciones, La muestra biológica puede almacenarse en condiciones biológicas durante hasta 24 horas antes de su uso en los métodos descritos en el presente documento.

20 En algunas realizaciones de los métodos para supervisar el tratamiento de deficiencia en vitamina D en un sujeto, la muestra biológica se trata o combina con sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS) antes de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconoce tanto 25-hidroxitamina D2 como 25-hidroxitamina D3. Como alternativa, la muestra biológica se puede tratar o combinar con sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS) simultáneamente con la puesta en contacto de la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconoce tanto 25-hidroxitamina D2 como 25-hidroxitamina D3. El ANS puede estar en 25 forma de un ácido o una sal de ANS (por ejemplo, sal de sodio de ANS, sal de potasio de ANS, sal de magnesio de ANS o sal de amonio de ANS). El ANS puede estar presente, por ejemplo, en un tampón de desplazamiento. Puede usarse opcionalmente metanol con el sulfonato de 8-amino-1-naftaleno (ANS) antes de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o simultáneamente con la puesta en contacto de la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Puede incluirse metanol, por ejemplo, en el 30 tampón de desplazamiento.

35 En algunas realizaciones de los métodos para supervisar el tratamiento de deficiencia en vitamina D en un sujeto, la muestra biológica también se trata o combina con sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS) y etilenglicol antes de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo que reconoce tanto 25-hidroxitamina D2 como 25-hidroxitamina D3 o fragmento de unión a antígeno. Como alternativa, la muestra biológica se puede tratar o combinar con sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS) y etilenglicol simultáneamente con la puesta en contacto de la muestra biológica con un anticuerpo que reconoce tanto 25-hidroxitamina D2 como 25-hidroxitamina D3 o fragmento de unión a antígeno. El ANS puede estar en forma de un ácido o una sal de ANS (por ejemplo, sal de sodio de ANS, sal de potasio de ANS, sal de magnesio de ANS o sal de amonio de ANS). El ANS y etilenglicol pueden estar presentes en un tampón de desplazamiento. Puede usarse opcionalmente metanol con el sulfonato de 8-amino-1-naftaleno (ANS) y etilenglicol 40 antes de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o simultáneamente con la puesta en contacto de la muestra biológica con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Puede incluirse metanol, por ejemplo, en el tampón de desplazamiento.

45 En algunas realizaciones de los métodos para supervisar el tratamiento de deficiencia en vitamina D en un sujeto, se añade un análogo de 25-hidroxitamina D a la muestra biológica después de la etapa de contacto. El análogo de 25-hidroxitamina D puede marcarse. El análogo de 25-hidroxitamina D o análogo de 25-hidroxitamina D marcado puede estar presente también en un tampón de estabilización que comprende sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS). El ANS puede estar en forma de un ácido o una sal de ANS (por ejemplo, sal de sodio de ANS, sal de potasio de ANS, sal de magnesio de ANS o sal de amonio de ANS).

50 Los análogos de vitamina D descritos en el presente documento se pueden basar en el uso de un derivado de vitamina D de carbono 22 (vitamina D-C22), que incluye un grupo carboxilo C22 cuando no está conjugado, como se representa en la Figura 1(a) (Hollis *et al.*, Clin. Chem. 39(3):529-33 (1993)). En algunas realizaciones, el análogo de vitamina D puede ser vitamina D-C22. En algunas realizaciones, el análogo de vitamina D puede estar conjugado con una proteína transportadora.

55 En algunas realizaciones de los métodos para supervisar el tratamiento de deficiencia en vitamina D en un sujeto, los análogos de vitamina D descritos pueden fijarse directamente al vehículo proteico. Por ejemplo, la vitamina D-C22

5 puede conjugarse directamente con albúmina de suero bovino (BSA). El número de análogos de vitamina D que puede conjugarse con un vehículo proteico dado variará basándose en el vehículo usado. Por ejemplo, BSA alojará la unión de un número relativamente bajo de proteínas, quizás de aproximadamente 10 a aproximadamente 25; como alternativa, un vehículo tal como hemocianina de lapa californiana (KLH) puede alojar de aproximadamente 200 a aproximadamente 300 moléculas antigénicas. Los expertos en la materia entenderán que puede usarse una amplia diversidad de proteínas transportadoras para los fines descritos en el presente documento. Algunos vehículos adecuados incluyen, KLH, KLH PEGilada, hemocianina de *Concholepas concholepas* (CCH), BSA cationizada y ovoalbúmina, por nombrar solo algunos.

10 La conjugación de proteína transportadora con el análogo de vitamina D puede producirse mediante el uso de un conector químico. La conjugación del análogo de vitamina D o derivado de vitamina D con la proteína puede realizarse mediante reacción entre grupos amino de la proteína y un grupo de éster de N-hidroxisuccinimida (éster de NHS) reactivo del análogo de vitamina D o derivado de vitamina D.

15 En algunas realizaciones de los métodos para supervisar el tratamiento de deficiencia en vitamina D en un sujeto, los niveles de vitamina D pueden detectarse en 20 minutos o menos partiendo del punto en el que la muestra biológica se combina con el tampón de desplazamiento.

La deficiencia en vitamina D en el sujeto puede ser indicativa de o asociada con una enfermedad. Las enfermedades asociadas con deficiencia en vitamina D pueden incluir: raquitismo, tensión arterial alta por osteomalacia, osteoporosis, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad cardiovascular, esquizofrenia, depresión, enfermedades del sistema nervioso, diabetes, enfermedad infecciosa, asma, alergia o cáncer.

20 También se proporcionan en el presente documento métodos para estabilizar el análogo de 25-hidroxivitamina D poniendo en contacto el análogo de 25-hidroxivitamina D con sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS). El ANS puede estar en forma de un ácido o una sal de ANS (por ejemplo, sal de sodio de ANS, sal de potasio de ANS, sal de magnesio de ANS o sal de amonio de ANS). El análogo de 25-hidroxivitamina D estabilizado con sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS) puede almacenarse durante más de 2 meses fuera de un sistema de ensayo. El análogo de 25-hidroxivitamina D estabilizado con sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS) puede almacenarse durante más de 7 días dentro de un sistema de ensayo.

30 También se proporcionan en el presente documento métodos para detectar deficiencia en vitamina D en un sujeto. En realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano. Las muestras biológicas para su uso en los métodos pueden ser sangre, suero sanguíneo o plasma sanguíneo procedentes del sujeto. Los métodos para detectar deficiencia en vitamina D en un sujeto implican determinar el nivel de 25-hidroxivitamina D total en una muestra biológica procedente del sujeto combinando la muestra biológica y un tampón de desplazamiento. La muestra biológica puede añadirse al tampón de desplazamiento o viceversa para formar una mezcla de ensayo. El tampón de desplazamiento desplaza la vitamina D de la proteína de unión a vitamina D. En realizaciones preferidas, el tampón de desplazamiento contiene sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS). El ANS puede estar en forma de un ácido o una sal de ANS (por ejemplo, sal de sodio de ANS, sal de potasio de ANS, sal de magnesio de ANS o sal de amonio de ANS). El tampón de desplazamiento puede contener además etilenglicol. En algunas realizaciones, el tampón de desplazamiento contiene ANS y metanol. En algunas realizaciones preferentes, el tampón de desplazamiento contiene ANS, etilenglicol y metanol.

40 A continuación, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une preferentemente con 25-hidroxivitamina D2, 25-hidroxivitamina D3 o inmunógeno basado en vitamina D-C22 conjugado con un primer marcador se combina con la mezcla de ensayo. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede añadirse a la mezcla de ensayo o viceversa y se convierte en un componente de la misma. El anticuerpo que se une preferentemente con 25-hidroxivitamina D2 y 25-hidroxivitamina D3 o inmunógeno basado en vitamina D-C22, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es preferentemente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se ha descrito anteriormente. En realizaciones preferidas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una CDR1 de Lc de la SEQ ID NO: 26, una CDR2 de Lc de la SEQ ID NO: 27 y una CDR3 de Lc de la SEQ ID NO: 28, una CDR1 de Hc de la SEQ ID NO: 10, una CDR2 de Hc de la SEQ ID NO: 11 y una CDR3 de Hc de la SEQ ID NO: 12. El anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 10H9. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une preferentemente con 25-hidroxivitamina D2, 25-hidroxivitamina D3 o inmunógeno basado en vitamina D-C22 puede inmovilizarse en un soporte de fase sólida. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une preferentemente con 25-hidroxivitamina D2, 25-hidroxivitamina D3 o inmunógeno basado en vitamina D-C22 puede conjugarse con una proteína transportadora. El complejo del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une preferentemente con 25-hidroxivitamina D2, 25-hidroxivitamina D3 o inmunógeno basado en vitamina D-C22 y la proteína transportadora también puede inmovilizarse en un soporte de fase sólida.

55 El primer marcador es preferentemente un marcador detectable. El primer marcador puede ser un compuesto quimioluminiscente (por ejemplo, un compuesto de éster de acridinio), un compuesto fosforescente, un compuesto fluorescente, un radiomarcador, biotina o una enzima. Los marcadores ejemplares mencionados pueden habitualmente detectarse solo cuando se excitan mediante métodos que incluyen, pero sin limitación, la adición de

diferentes productos químicos, estimulación por luz o exposición a sustrato u otros compuestos. Cuando se usa compuesto de éster de acridinio, la quimioluminiscencia es desencadenada por peróxido y ácido/base lo que da como resultado un destello que puede leerse mediante instrumentación apropiada. Puede usarse una etapa de lavado opcional antes de iniciar la capacidad de detección del marcador detectable.

5 A continuación se combina un análogo de 25-hidroxivitamina D que tiene un segundo marcador con la mezcla de ensayo. El análogo de 25-hidroxivitamina D puede añadirse a la mezcla de ensayo o viceversa y se convierte en un componente de la misma. El segundo marcador puede ser fluoresceína para unión con anticuerpo antifluoresceína, biotina para unión con avidina, estreptavidina o anticuerpo anti-biotina, digoxigenina para unión con anticuerpo antidigoxigenina u otro hapteno y compañero de unión. El análogo de 25-hidroxivitamina D puede estar presente en
10 un tampón de estabilización que comprende sulfonato de 8-anilino-1-naftaleno (ANS). El ANS puede estar en forma de un ácido o una sal de ANS (por ejemplo, sal de sodio de ANS, sal de potasio de ANS, sal de magnesio de ANS o sal de amonio de ANS). En algunas realizaciones, el análogo de 25-hidroxivitamina D está conjugado con una proteína transportadora. La proteína transportadora puede ser albúmina de suero bovino, ovoalbúmina, inmunoglobulina o gamma globulina IgG bovina.

15 Un soporte de fase sólida conjugado con un anticuerpo que reconoce el segundo marcador también se combina con la mezcla de ensayo. El soporte de fase sólida conjugado con el anticuerpo que reconoce el segundo marcador puede añadirse a la mezcla de ensayo o viceversa y se convierte en un componente de la mezcla de ensayo. El anticuerpo que se conjuga con el soporte de fase sólida puede ser un anticuerpo que se une con fluoresceína.

20 Los soportes de fase sólida para su uso en los métodos descritos en el presente documento incluyen partículas paramagnéticas; dextrano reticulado disponible con la marca comercial SEPHADEX (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N.J.); agarosa; partículas o perlas de poliestireno; cloruro de polivinilo, poliestireno, poliacrilamida reticulada, redes a base de nitrocelulosa o nailon tales como láminas, tiras o palas; o tubos, placas o los pocillos de una placa de microtitulación tales como las hechas de poliestireno o polivinilcloruro. Cuando se usan partículas paramagnéticas, puede usarse alguna fuente de un campo magnético para retener las partículas y moléculas unidas
25 directa o indirectamente a las partículas durante una etapa de lavado opcional. Las moléculas pueden unirse covalentemente, mediante enlaces salinos, enlaces de hidrógeno u otro tipo de enlace.

El nivel de 25-hidroxivitamina D total en la muestra biológica se determina midiendo la señal emitida por el primer marcador, en donde un nivel reducido de 25-hidroxivitamina D en la muestra biológica en relación con el nivel en un control normal o un nivel umbral de 30 ng/ml es indicativo de una deficiencia en vitamina D en el sujeto.

30 Los inmunorreactivos de cualquier sistema de diagnóstico descrito en el presente documento pueden proporcionarse en solución, como una dispersión líquida o como un polvo sustancialmente seco, por ejemplo, en forma liofilizada.

En algunas realizaciones, la deficiencia en vitamina D pueden detectarse en 20 minutos o menos partiendo del punto en el que la muestra biológica se combina con el tampón de desplazamiento.

35 La deficiencia en vitamina D en el sujeto puede ser indicativa de una enfermedad. La enfermedad puede incluir: raquitismo, osteomalacia, tensión arterial alta, osteoporosis, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad cardiovascular, esquizofrenia, depresión, enfermedades del sistema nervioso, diabetes, enfermedad infecciosa, asma, alergia o cáncer.

Kits

40 Los kits pueden comprender un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se describe en el presente documento e instrucciones, por ejemplo, para recoger una muestra biológica de un sujeto y/o para usar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para determinar la cantidad de vitamina D total en una muestra biológica. En realizaciones preferidas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende un marcador detectable como se describe en el presente documento. El kit también puede comprender un análogo de vitamina D unido a un soporte sólido. En algunas realizaciones, el kit puede comprender una curva patrón o conjunto de datos que muestran una
45 correlación de la cantidad o el nivel de vitamina D con niveles normales y/o deficientes de vitamina D.

Se proporcionan los siguientes ejemplos para describir las realizaciones descritas en el presente documento en mayor detalle. Su objetivo es ilustrar, no limitar, las realizaciones.

Ejemplos

EJEMPLO I - SÍNTESIS DE MOLÉCULAS Y COMPUESTOS BASADOS EN VITAMINA D-C22

50 Para producir antígenos basados en vitamina D-C22 fue necesaria una forma manipulable de la molécula. Para conseguir esto, se acometieron intentos de producir ácido de vitamina D-C22 mediante un esquema de síntesis basado

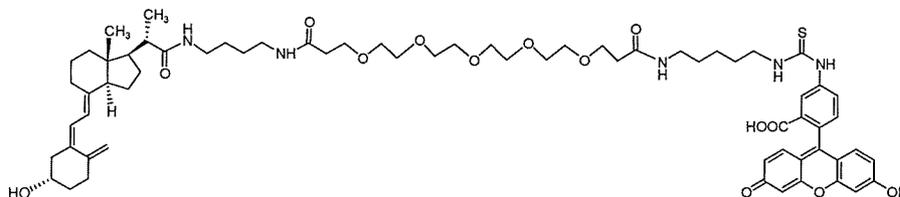
en el de Hollis y Napoli (Clin.Chem, 31:1815-1819 (1985)). En resumen, se hizo reaccionar acetato de ácido 23, 24-Bisnor-5-colénico-3 β -OL (2,50 g) con metanol (0,312 ml), dicitclohexilcarbodiimida (1,59 g) y N,N-dimetilaminopiridina (160 mg) en diclorometano (25 ml) durante 3 horas para proporcionar acetato de ácido 23, 24-bisnor-5-colénico-3 β -OL, éster metílico (1,808 g). El éster metílico (1,808 g) se bromó con N-bromosuccinimida (1,05 g) /azoisobutironitrilo (51,7 mg) en hexano (200 ml) a reflujo durante 30 minutos, seguido de deshidrobromación con fluoruro de tetrabutilamonio (1 M en THF, 23,8 ml) en THF (112 ml) a temperatura ambiente durante 2 horas para proporcionar éster metílico de acetato de ácido 23, 24-Bisnor-5, 7-colediénico-3 β -OL (1,21 g).

Acetato de ácido 23, 24-Bisnor-5, 7-colediénico-3 β -OL, éster metílico (1,21 g) se hizo reaccionar con hidróxido de potasio (0,50 g) en metanol (18 ml) y éter etílico (22 ml) a temperatura ambiente durante 2,5 horas para producir éster metílico de ácido 23, 24-bisnor-5, 7-colediénico-3 β -OL (0,962 g). ácido 23, 24-Bisnor-5, 7-colediénico-3 β -OL, éster metílico (0,960 g) se irradió bajo una lámpara de mercurio a 450 w con un filtro Vycon en éter (1100 ml) de -10 a 0 °C durante 3 minutos y 30 segundos dos veces, después se separó por cromatografía en columna en gel de sílice para proporcionar éster metílico de previtamina D-C22 que se sometió a reflujo en etanol (100 ml) durante 3 horas para producir éster metílico de vitamina D-C22 (0,389 g). Se hizo reaccionar éster metílico de vitamina D-C22 (249 mg) con hidróxido de potasio (6,25 g) en metanol (30 ml) a 60 °C durante 5 horas para proporcionar ácido de vitamina D-C22 (165 mg). (Figura 2.)

Para formar compuestos conjugados con vitamina D-C22 fue necesario un precursor de NHS. para conseguir esto se hizo reaccionar ácido de vitamina D-C22 (165 mg) con dicitclohexilcarbodiimida (116 mg) y N-hidroxisuccinimida (64 mg) en 1, 4-dioxano. después se hizo reaccionar con 1, 4-diaminobutano (480 ul) a temperatura ambiente durante 2 horas para proporcionar vitamina D-DAB (141 mg). Los reactivos sensibles a proteínas, vitamina D-DAB-Suberoil-NHS y vitamina D-DAB-PEG5-NHS, se prepararon a partir de vitamina D-DAB mediante reacción con exceso de suberato de disuccinimidilo o PEG5-Di-NHS. Los ésteres de NHS se purificaron mediante HPLC de fase inversa preparatoria a través de una columna C18. La vitamina D-DAB (30 mg) se hizo reaccionar con exceso de suberato de disuccinimidilo (DSS, 133 mg) en DMF (1,2 ml) y trietilamina (15 ul) durante 3,5 horas. El producto (24,5 mg) se purificó mediante HPLC preparatoria a través de una columna de Synergi Hydro-RP para producir vitamina D-DAB-Suberoil-NHS. La vitamina D-DAB (41 mg) se hizo reaccionar con exceso de Bis-PEG5-NHS (282 mg) en DMF (2,0 ml) y trietilamina (20 ul) durante 3,5 horas. El producto (33,7 mg) se purificó mediante HPLC preparatoria a través de una columna de Synergi Hydro-RP para producir vitamina D-DAB-PEG5-NHS. (Figura 3.) Se prepararon conjugados proteicos mediante reacción entre éster de NHS y los grupos amino de lisina de las proteínas como se representa en la Figura 4. Se preparó Vit D-DAB-Suberoil-BSA mediante la reacción de Vit D-DAB-Suberoil-NHS (5 mg) con BSA (10 mg) en una mezcla de tampón de fosfato 0,1 M, pH 7,5 (1 ml) y DMF (0,4 ml) a temperatura ambiente durante 2 h y se purificó por centrifugación usando PBS, pH 7,2 para intercambio de tampón. La espectrometría de masas de MALDI-TOF mostró carga de 14 marcadores de Vitamina D por BSA.

Se prepararon conjugados de Vitamina D-DAB-PEG5-BSA-Fluoresceína (Figura 5) mediante una conjugación de dos etapas por reacción entre el tiol libre de BSA con fluoresceína-5-maleimida seguido de reacción de los grupos amino de lisina con vitamina D-DAB-PEG5-NHS. Los conjugados se aislaron mediante filtración en gel usando una columna Sephadex G25. Se descubrió que el conjugado preparado usando una relación molar de fluoresceína-5-maleimida con respecto a BSA 10:1 seguido de conjugación a relación molar de vitamina D-DAB-PEG5-NHS con respecto a BSA 20:1 produjo las mejores curvas de ensayo Centaur®.

Se prepararon conjugados de vitamina D-fluoresceína y se usaron como antígeno de recubrimiento de partículas magnéticas para el ensayo Centaur®. También se obtuvieron buenos resultados de inmunoensayo usando un derivado de moléculas pequeñas, vitamina D-DAB-PEG5-aminopentil-tioureidil fluoresceína, PM 1208 (estructura posterior), como un antígeno de recubrimiento de partículas magnéticas.



45 EJEMPLO II - PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS REACTIVOS A COMPUESTOS ANTIGÉNICOS DE VITAMINA D-C22

Se realizaron experimentos para producir anticuerpos que podrían unirse preferentemente con moléculas que tienen aspectos estructurales de la molécula antigénica de vitamina D-C22. Estos experimentos se realizaron de acuerdo con el método de Galfre *et al.* (Nature, 266:550 (1977)), modificado por Oi y Herzenberg (Selected Methods in Cellular Immunology (1980)). Inicialmente, se inmunizaron ratones BALB/c con vitamina D-C22 BSA emulsionada en adyuvante completo de Freund seguido de una inmunización secundaria usando adyuvante incompleto de Freund. Se recogieron sueros de ratones inmunizados dos semanas después de la inmunización secundaria.

5 Se ensayaron sueros recogidos para determinar la reactividad de antígenos mediante ELISA de la siguiente manera: se incubaron placas de microtitulación recubiertas con vitamina D-C22 KLH con antisueros de ratón, diluidos en tampón de dilución, durante una hora. Las placas se lavaron y se añadió un anticuerpo secundario (de cabra anti-IgG de ratón) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HPRo) en tampón de dilución y se incubaron durante 30 minutos. Las placas se lavaron y se añadió el sustrato colorimétrico 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). El color generado se detuvo usando ácido sulfúrico IN y la densidad óptica se midió a 450 nm. Los sueros de los cinco ratones ensayados mostraron reactividad sustancial en relación con suero de ratón normal (NMS) (Tabla 2).

Tabla 2: Detección de vitamina D-C22 mediante sueros de ratones inmunizados

RECUBRIMIENTO: Vit D-C22 Diaminobutano-Suberoil-KLH a 500 ng/ml							
Vit D en muestra de sangre inicial 08/12/05	N.º DE RATÓN	NMS	0	1	2	3	4
	1:12800	0,070	0,931	1,357	1,669	1,795	1,622
	1:6400	0,069	1,532	2,020	2,478	2,581	2,310
	1:3200	0,070	2,234	2,685	3,126	3,161	2,845
	1:1600	0,077	2,940	3,228	3,520	3,504	3,303
	1:800	0,085	3,414	3,552	3,582	3,565	3,552
	1:400	0,100	3,585	3,573	3,680	3,630	3,578
	1:200	0,128	3,664	3,689	3,656	3,678	3,640
	1:100	0,180	3,628	3,666	3,645	3,605	3,576

10 EJEMPLO III - PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES REACTIVOS A COMPUESTOS ANTIGÉNICOS DE VITAMINA D-C22

15 Se seleccionaron ratones que muestran una respuesta inmunitaria positiva a antígenos de vitamina D-C22 para desarrollo de anticuerpos monoclonales. En resumen, se fusionaron células del bazo recogidas de ratones seleccionados con células de mieloma Sp2/0 de ratón. Se seleccionaron hibridomas resultantes que produjeron anticuerpos reactivos a 25-hidroxivitamina D2 y 25-hidroxivitamina D3 y se clonaron al menos dos veces por el procedimiento de dilución limitante para obtener líneas celulares productoras de anticuerpos monoclonales. Una línea celular monoclonal que se identificó y ensayó adicionalmente fue el hibridoma 10H9.

20 Después del aislamiento de clones de hibridoma, se realizaron estudios para determinar la capacidad relativa de los anticuerpos para unirse tanto con 25-hidroxivitamina D2 como con 25-hidroxivitamina D3. Para evaluar esto, se realizaron ensayos de desplazamiento de anticuerpos para determinar el grado en que la unión entre vitamina D-C22 y un anticuerpo reactivo inducido contra el antígeno (10H9) podría alterarse por la presencia de 25-hidroxivitamina D2 o 25-hidroxivitamina D3. El sobrenadante de cultivo celular de las líneas celulares de hibridoma 10H9 reactivas a vitamina D-C22 se coincubaron en presencia o ausencia de 25-hidroxivitamina D2 o 25-hidroxivitamina D3 en placas de microtitulación recubiertas con vitamina D-C22 KLH durante 1 hora. Después de lavar las placas, se añadió HRPO-IgG de cabra anti ratón y se incubó durante 30 minutos. Las placas se lavaron y después se incubaron con tetrametil benzidina (TMB). El color generado se detuvo usando ácido sulfúrico IN y la densidad óptica se midió a 450 nm. Como se expone en la Tabla 3 (y como se representa en la Figura 6), la unión de anticuerpos con vitamina D-C22 KLH se alteró de una manera dependiente de la concentración mediante coincubación con 25-hidroxivitamina D2 o 25-hidroxivitamina D3. Tanto 25-hidroxivitamina D2 como 25-hidroxivitamina D3 mostraron perfiles de alteración de la unión sustancialmente similares lo que es característico de afinidad equimolar del anticuerpo ensayado.

30

Tabla 3: Desplazamiento de anticuerpos reactivos a vitamina D-C22 mediante 25-hidroxitamina D2 o 25-hidroxitamina D3.

Recubrimiento: Vit D C22-Diaminobutano-Suberoil KLH a 50 ng/ml				
Ag a (Conc. final)		0	25 OH-D2	25 OH-D3
			0,4 ug/ml	0,4 ug/ml
Sobrenadante de cultivo celular de Vit D-C22 10 H9 a (Dilución final)	1:4	1,997	0,323	0,384
	1:16	1,244	0,154	0,176
	1:64	0,672	0,097	0,105
	1:256	0,313	0,086	0,090
Indicador. GAM-IgG-HRP (Fc) a 1:20K				

5 A continuación, se realizaron experimentos de desplazamiento usando anticuerpo purificado, en lugar de sobrenadante celular. En este experimento, el anticuerpo de interés se aplicó directamente sobre la placa de microtitulación mediante una incubación de dos horas. Las placas recubiertas se lavaron y después se coincubaron con 25-hidroxitamina D2 o 25-hidroxitamina D3 en presencia de vitamina D-C22-diaminobutano-suberoilo conjugado con fosfatasa alcalina. Después de 30 minutos las placas se lavaron y se reveló color añadiendo el sustrato fosfato de p-nitrofenilo (PNPP). La densidad óptica de la solución coloreada se midió a 405 nm. De nuevo, la unión de 10H9 con vitamina D-C22 se alteró de una manera dependiente de la concentración mediante coincubación con 25-hidroxitamina D2 o 25-hidroxitamina D3 (Tabla 4). Tanto 25-hidroxitamina D2 como 25-hidroxitamina D3 mostraron perfiles de alteración de la unión sustancialmente similares lo que es característico de afinidad equimolar del anticuerpo ensayado (Figura 7).

Tabla 4: Desplazamiento de anticuerpos reactivos a vitamina D-C22 mediante 25-hidroxitamina D2 o 25-hidroxitamina D3.

Recubrimiento de Vit D-C22 MAD 10H9 50 ug/ml a 1 ug/ml		D.O.
26 ul de 26OH.VIT D2 a concentración final indicada (ng/ml)	0	1,277
	5	1,189
	10	1,007
	25	0,771
	100	0,106
	200	0,080
	400	0,069
	1000	0,063
26 ul de 26OH-VIT D3 a concentración final indicada (ng/ml)	0	1,213
	5	1,083
	10	0,800
	25	0,519
	100	0,115
	200	0,089
	400	0,077
	1000	0,069
-26 ul de N-(Vit D C22 Carbonil)-1,4-Diaminobutano-N'-Buberoil-ALK.-Fos. (JL806-6X) a 100 ng/ml (final) en D.B.		

ENSAYO DE VITAMINA D

Se añade muestra biológica a una cubeta de reacción seguida de tampón de desplazamiento y se permitió que reaccionara durante 4,5 minutos. Se añade anticuerpo monoclonal conjugado con éster de acridinio y se permite que reaccione durante 5,5 minutos para unirse con 25-hidroxivitamina D en la muestra. Se añade un análogo de 25-hidroxivitamina D conjugado con albúmina de suero bovino y fluoresceína junto con partículas paramagnéticas recubiertas con antifluoresceína y se permite que reaccionen durante 3,75 minutos. La cubeta de reacción se lava y se añaden reactivos ácidos y básicos para iniciar la reacción quimioluminiscente. El tiempo hasta el resultado es de 18 minutos. Existe una relación inversa entre la cantidad de 25-hidroxivitamina D en la muestra de paciente y la cantidad de unidades de luz relativas (ULR) detectadas por el sistema.

10 **Ensayo:** El ensayo de Vitamina D Total ADVIA Centaur es un inmunoensayo competitivo de anticuerpos de un pase, de 18 minutos, que usa un anticuerpo monoclonal marcado con fluoresceína unido covalentemente con partículas paramagnéticas (PPM), un anticuerpo monoclonal marcado con éster de acridinio (AE) y un análogo de vitamina D marcado con fluoresceína (Figura 8). El ensayo de Vitamina D total requiere 20 µl de volumen de muestra para una única determinación. El tiempo hasta el primer resultado es de 18 minutos y el rendimiento es de 240 ensayos/hora.

15 En resumen, la primera etapa del inmunoensayo competitivo de hapteno/anticuerpo de etapas secuenciales usando tecnología quimioluminiscente comienza con el analizador distribuyendo 20 µl de muestra biológica a una cubeta seguido de la adición de 200 µl de tampón de desplazamiento (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, azida de sodio al 0,09 %, pH=7,5) que contiene sal de amonio de ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico (Sigma-aldrich, San Luis, MO) y etilenglicol (Sigma-aldrich, San Luis, MO) e incubación durante 4,5 minutos a 37 °C. Se añade reactivo ligero (50 µl) que contiene un anticuerpo monoclonal anti 25-hidroxi Vitamina D marcado con éster de acridinio (anticuerpo monoclonal 10H9) a la mezcla y se incuba durante 5,5 min a 37 °C. Se añaden conjugado de C22-PEG-BSA-fluoresceína (50 µl) y micropartículas paramagnéticas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-fluoresceína (100 µl) a la mezcla y se incuban durante 3,75 minutos a 37 °C. La cuarta etapa es separación de complejo de fase sólida con conjugado de C22-PEG-BSA-fluoresceína unido y anticuerpo monoclonal anti 25-hidroxi vitamina D marcado con éster de acridinio, seguido de lavado tres veces para retirar cualquier reactivo ligero. La última es la distribución secuencial de 300 µl de cada reactivo ácido y después reactivo básico para iniciar la reacción quimioluminiscente. El tiempo de incubación total de la muestra al resultado es de 18 minutos. Hay una relación indirecta entre la cantidad de 25-hidroxivitamina D presente en la muestra biológica y la cantidad de quimioluminiscencia cuantificada como unidades de luz relativas (ULR). En el ensayo basado en Centaur, hay una relación inversa entre las ULR emitidas por el éster de acridinio y la cantidad de vitamina D debido a que la 25-hidroxivitamina D liberada de la proteína transportadora en el plasma compite con la Vitamina D-BSA-Fluoresceína por la unión con una cantidad limitada del anticuerpo monoclonal 10H9 marcado con acridinio. Niveles mayores de 25(OH)D en la muestra del paciente reducirían la cantidad de complejo de acridinio-MAb-VitD-BSA-Fluoresceína en las partículas magnéticas dando como resultado ULR menores.

35 **Precisión:** El estudio de precisión se basó en el protocolo de CLSI EP5-A2: dos ciclos al día durante 10 días en un único sistema de ADVIA Centaur. Se determinó la precisión del ensayo usando muestras con Vitamina D Total que varía de 4 a 120 ng/ml.

40 **Sensibilidad analítica:** La sensibilidad analítica se define como la concentración que corresponde a la señal media más 2 DT obtenida del patrón más bajo, expresada en unidades de luz relativas (ULR). Es estudio de sensibilidad analítica se realizó siguiendo el protocolo de CLSI EP5-A2. La sensibilidad analítica se determinó usando 60 repeticiones del patrón más bajo.

45 **Límite de blanco, límite de detección y sensibilidad funcional:** El límite de blanco se define como la concentración de analito que corresponde al percentil 95 de la distribución de un grupo básico negativo humano. El patrón bajo de vitamina D total se ensayó 20 veces usando dos lotes de reactivos en tres sistemas (n = 120). El límite de detección (LoD) se determina según el protocolo de CLSI EP17-A. El límite de detección se define como la menor concentración de vitamina D que puede detectarse con 95 % de probabilidad. El LoD se determinó usando muestras de vitamina D de bajo nivel que se ensayaron 20 veces usando dos lotes de reactivos en tres sistemas (n = 120). La sensibilidad funcional se determinó usando un único instrumento durante 10 días. Se realizaron dos ciclos al día por duplicado para un total de 60 repeticiones. Las concentraciones de miembros del panel de sensibilidad de Vitamina D Total ADVIA Centaur variaron de 3,0 a 20,0 ng/ml. Las concentraciones se calcularon usando curvas de calibración de dos puntos, de día cero, dentro del lote.

Estudios de interferencia: Se evaluó la interferencia de sustancias endógenas y no endógenas siguiendo las directrices en NCCLS EP-7A. A cada muestra se añadió un interferente y se comparó con un control coincidente sin adición.

55 **Reactividad cruzada:** Se analizaron cinco derivados de vitamina D usando el ensayo de Vitamina D Total ADVIA Centaur. Los derivados de vitamina D se añadieron a una muestra que contenía 27 ng/ml de vitamina D total. Se ensayaron tres repeticiones de las muestras añadidas y se determinó la concentración de vitamina D total.

Estudio de tipo tubo: La correlación de tubos separadores de EDTA y suero (SST) se analizó usando el ensayo de Vitamina D Total ADVIA Centaur. Se recogieron tubos de tapón rojo de suero, SST y EDTA de 119 donantes y se ensayaron usando el ensayo total de Vitamina D Total Centaur. Se evaluaron tres repeticiones de cada muestra. Se determinó la correlación de regresión lineal entre suero y SST y suero frente a EDTA.

5 **Correlación de métodos:** El ensayo de Vitamina D Total ADVIA Centaur se comparó con un inmunoensayo de Vitamina D Total, con FDA eliminado, disponible en el mercado usando 199 muestras de pacientes, una única repetición para cada método. La concentración de las muestras varió de 5 a 150 ng/ml. Además, se ensayaron 23 muestras de pacientes mediante CL-EM/EM y el ensayo de Vitamina D Total ADVIA Centaur. Las muestras en esta segunda población variaron de 11 a 82 ng/ml.

10 *Resultados*

Los datos obtenidos con el ensayo de vitamina D ADVIA Centaur demostraron la detección equimolar de 25(OH)D₂ y 25(OH)D₃ y mostraron la trayectoria hasta CL-EM/EM. Se determinó que la reactividad cruzada con 25(OH)D₂ era 105 % a 50 ng/ml. El ensayo demostró un límite de detección (LoD) de menos de 3,0 ng/ml, una sensibilidad funcional (20 % de dosis total de CV) de menos de 4 ng/ml y un límite superior de 250 ng/ml. Los CV de ensayos totales fueron 6,4 %, 7,1 %, 4,2 % y 3,7 % para muestras a 22,1, 52,3, 121 y 153 ng/ml, respectivamente. Se ha demostrado la linealidad hasta 240 ng/ml. Se realizó un estudio de correlación frente a CL-EM/EM con 150 muestras de suero, produciendo una pendiente de 0,96, intersección de 1,0 y coeficiente de regresión de 0,97.

15 **Precisión:** El perfil de precisión del ensayo de Vitamina D Total ADVIA Centaur demuestra un CV total entre 8,8 % a 7,65 ng/ml y 2,0 % a 123,36 ng/ml de vitamina D total 25(OH). Se muestra análisis de precisión en la Tabla 5.

20 Tabla 5. Análisis de precisión de ensayo de Vitamina D Total ADVIA Centaur

Muestra	Media (ng/ml)	DT dentro del ciclo (ng/ml)	CV dentro del ciclo (%)	DT total (ng/ml)	CV total (%)
1	7,65	0,65	8,5	0,67	8,8
2	10,65	0,85	8,0	1,07	10,1
3	13,11	0,84	6,4	0,91	6,9
4	15,87	1,02	6,4	1,18	7,4
5	18,40	1,31	7,1	1,44	7,8
6	22,63	1,79	7,9	1,79	7,9
7	59,75	1,76	3,0	1,92	3,2
8	99,63	1,95	2,0	2,07	2,1
9	112,74	1,98	1,8	3,07	2,7
10	115,71	1,98	1,7	2,55	2,2
11	123,36	2,29	1,9	2,51	2,0

Sensibilidad analítica: La sensibilidad analítica del ensayo de Vitamina D Total ADVIA Centaur fue de 2,4 ng/ml. En la Tabla 6 se muestra la sensibilidad analítica.

Tabla 6. Sensibilidad analítica del ensayo de Vitamina D Total ADVIA Centaur

Muestra	Repeticiones	ULR media + 2 DT	Dosis (ng/ml)
Blanco de vitamina D	60	688200	2,4

25 **Límite de blanco, límite de detección y sensibilidad funcional:** El límite de blanco del ensayo de Vitamina D Total ADVIA Centaur fue de 2,8 ng/ml, el límite de detección fue de 3,8 ng/ml y la sensibilidad funcional fue de 4 ng/ml (Figura 9).

Estudios de interferencia: El ensayo de Vitamina D Total ADVIA Centaur demostró ≤10 % de desviación a las concentraciones ensayadas para interferentes endógenos. Los resultados de estudios de interferencia endógena se

muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados de estudios de interferencia para ensayo de Vitamina D Total ADVIA Centaur

Interferente	Concentración	Vitamina D Total esperada (ng/ml)	Vitamina D Total observada (ng/ml)	Desviación (%)
Bilirrubina no conjugada	60 mg/dl	30,88	32,67	5,77
Bilirrubina conjugada	60 mg/dl	33,82	30,67	-9,31
Albúmina	9 g/dl	22,5	20,4	-9,33
Hemoglobina	500 mg/dl	29,08	29,70	2,13
Triglicéridos	500 mg/dl	22,7	23,6	3,96
Ácido úrico	20 mg/dl	35,45	33,45	-5,64

Reactividad cruzada: El ensayo de Vitamina D Total ADVIA Centaur demostró reactividad cruzada muy baja con las formas no hidroxiladas de vitamina D2 y vitamina D3, y con 3-epi-25(OH)D3. Los resultados del análisis de reactividad cruzada se muestran en la Tabla 8.

5

Tabla 8. Reactividad cruzada del ensayo de Vitamina D Total ADVIA Centaur

Reactivo cruzado	Concentración (ng/ml)	Vitamina D Total esperada (endógena) (ng/ml)	Vitamina D Total observada (ng/ml)	Reactividad cruzada (%)
25-(OH)-Vit D3	27	0	27	100
25-(OH)-Vit D2	30	27	58	102
Vitamina D2	100	27	28	0,04
Vitamina D3	100	27	28	0,04
3-epi-25(OH)D3	100	27	27	0,0

Estudio de tipo tubo: Se realizó una correlación de tipo tubo de muestras con 119 muestras de donantes recogidas en tipos de tubos de tapón rojo de suero, SST y EDTA. El análisis de regresión entre tapón rojo de suero y SST demuestra un coeficiente de correlación (R) de 0,999, una pendiente de 1,01 y una intersección de -0,14 (Figura 10). El análisis de regresión entre tapón rojo de suero y EDTA demuestra un coeficiente de correlación (R) de 0,997, una pendiente de 1,00 y una intersección de 0,41 (Figura 11).

10

Comparación de métodos: Se realizó una correlación de muestras con 199 muestras que compara el ensayo de Vitamina D Total ADVIA Centaur con un ensayo de Vitamina D Total, con FDA eliminado, disponible en el mercado. El análisis de regresión demostró un coeficiente de correlación (R) de 0,993, una pendiente de 1,00 y una intersección de 1,61 (Figura 12). Además se ensayaron 23 muestras comparando el ensayo de Vitamina D Total ADVIA Centaur con un ensayo de CLEM/EM de Vitamina D Total disponible en el mercado. El análisis de regresión demostró un coeficiente de correlación (R) de 0,98, una pendiente de 1,03 y una intersección de -2,3 (Figura 13).

15

SEQ ID NO.	Secuencia
1	TTTTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCG
2	TACACCATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAAC
3	TTTACTATCTATAATCAGAAG

ES 2 710 449 T3

SEQ ID NO.	Secuencia
4	ATAAGAGCGCATTACGACGGGAGAGTT
5	GTGCAGCTGCTCGAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGA GCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTC ACTGAC
6	CTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAATGGT
7	TTCAAGGGCAAGGCCACATTAACGTAGACAAGTCATCCAG CACAGCCTACATGGAACCTCCTCAGTCTGACATCTGAAGACTC TGCAGTCTATTACTTT
8	GTGCAGCTGCTCGAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGA GCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTC ACTGACTACACCATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAA GAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAATGGTTT TACTATCTATAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTAAC TGTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGAACCTCCTCAG TCTGACATCTGAAGACTCTGCAGTCTATTACTTTATAAGAGC GCATTACGACGGGAGAGTTTTTTGGGGCCAAGGCACCACTCT CACAGTCTCCTCG
9	FWGQGTTLVSS
10	YTMNWVKQSHGKN
11	FTIYNQK
12	IRAHYDGRV
13	VQLLESGPELVKPGASMKISCKASGYSFTD
14	LEWIGLINPYNG
15	FKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYF
16	VQLLESGPELVKPGASMKISCKASGYSFTDYTMNWVKQSHGK NLEWIGLINPYNGFTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLT SEDSAVYYFIRAHYDGRVFWGQGTTLVSS
17	ACGTTCCGAGGGGGACCAAGCTAGAAATAAACGG
18	CAGAGCCTTGACACAGTAATGGAAACACCTATTTACAT
19	CTGATCTACCAAGTTTCCAAC
20	TGCTCTCAAATTACACATTTTCTCCC
21	TGTGAACTAGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCTGTC AGTCTTGGAGATCAAGCCTCCGTCTCTTGCAGATCTAGT
22	CGGTACCTGCAGAAGCCAGCCAGTCTCAAAGCTC
23	CGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCA GGGACAGATTTACACTCAAGATCACCAGAGTGGAGGCTGA GGATCTGGGAGTTTATTTTC

SEQ ID NO.	Secuencia
24	TGTGAACTAGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCTGTC AGTCTTGGAGATCAAGCCTCCGTCTCTTGCAGATCTAGTCAG AGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTATTTACATCGGTAC CTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACCAA GTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGC AGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCACCAGAGT GGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAATTAC ACATTTTCCTCCCACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTAGAAAT AAAACGG
25	TFGGGTKLEIKR
26	QSLVHSNGNTYLH
27	LIYQVSN
28	CSQITHFPP
29	CELVMTQSPLSLPVSLGDQASVSCRSS
30	RYLQKPGQSPKL
31	RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKITRVEAEDLGVYF
32	CELVMTQSPLSLPVSLGDQASVSCRSSQSLVHSNGNTYLHRYLQ KPGQSPKLLIYQVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKITRVEAEDL GVYFCSQITHFPPPTFGGGGTKLEIKR

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS, INC. SPENCER LIN QIMU LIAO BRUCE CAMPBELL

<120> ANTICUERPOS PARA 25-HIDROXIVITAMINA D2 Y D3 Y USOS DE LOS MISMOS

<130> SMSD-0099

5 <140>
<141>

<150> 61/488.630
<151> 20/05/2011

<160> 36

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 1
tttggggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctcg 36

20 <210> 2
<211> 39

ES 2 710 449 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

5 <400> 2
 tacacatga actgggtgaa gcagagccat ggaaagaac 39

<210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 3
 ttactatct ataacagaa g 21

15 <210> 4
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 4
 ataagagcgc attacgacgg gagagtt 27

25 <210> 5
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 5

gtgcagctgc tgcagtctgg acctgagctg gtgaagcctg gagcttcaat gaagatatcc 60

tgcaaggctt ctggttactc attcactgac 90

30

<210> 6
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 6
 cttgagtga ttgacttat taatccttac aatggt 36

40 <210> 7
 <211> 99
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 710 449 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 7

ttcaagggca aggccacatt aactgtagac aagtcaccca gcacagccta catggaactc 60
ctcagttctga catctgaaga ctctgcagtc tattacttt 99

5

<210> 8

<211> 348

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 8

gtgcagctgc tcgagttctgg acctgagctg gtgaagcctg gagcttcaat gaagatatcc 60
tgcaaggctt ctggttactc attcactgac tacaccatga actgggtgaa gcagagccat 120
ggaaagaacc ttgagtggat tggacttatt aatccttaca atggttttac tatctataat 180
cagaagttca agggcaaggc cacattaact gtagacaagt catccagcac agcctacatg 240
gaactcctca gtctgacatc tgaagactct gcagttctatt actttataag agcgcattac 300
gacgggagag ttttttgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcg 348

15

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 9

20

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 10

Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn
1 5 10

30

<210> 11

<211> 7

ES 2 710 449 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5 <400> 11

Phe Thr Ile Tyr Asn Gln Lys
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 12

Ile Arg Ala His Tyr Asp Gly Arg Val
1 5

15 <210> 13
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 13

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
1 5 10 15

Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp
20 25 30

25 <210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 14

30 Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly
1 5 10

<210> 15
<211> 33
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>

ES 2 710 449 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 15

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 1 5 10 15

Tyr Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
 20 25 30

Phe

5 <210> 16
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

10 <400> 16

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15

Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Thr
 20 25 30

Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45

Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 50 55 60

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80

Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Phe Ile
 85 90 95

Arg Ala His Tyr Asp Gly Arg Val Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

15 <210> 17
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 710 449 T3

	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 17 acgttcggag gggggaccaa gctagaaata aaacgg	36
5	<210> 18 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
10	<400> 18 cagagcctg tacacagtaa tggaaacacc tatttcat	39
	<210> 19 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 19 ctgatctacc aagttccaa c	21
20	<210> 20 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
25	<400> 20 tgctctcaaa ttacacattt tcctccc	27
	<210> 21 <211> 81 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 21	
	tgtgaactag tgatgaccca gtctccactc tcctgcctg tcagtcttgg agatcaagcc	60
35	tccgtctctt gcagatctag t	81
	<210> 22 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	

ES 2 710 449 T3

<400> 22
 cggtacctgc agaagccagg ccagttctcca aagctc 36

5 <210> 23
 <211> 102
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 23

cgattttctg ggggccaga caggttcagt ggcagtggat cagggacaga tttcacactc 60

10 aagatcacca gagtggaggc tgaggatctg ggagtttatt tc 102

<210> 24
 <211> 342
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 24

tgtgaactag tgatgaccca gtctccactc tcctgcctg tcagtcttgg agatcaagcc 60

tccgtctctt gcagatctag tcagagcctt gtacacagta atggaaacac ctatttacat 120

cggtacctgc agaagccagg ccagttctcca aagctcctga tctaccaagt ttccaaccga 180

ttttctgggg tcccagacag gttcagtggc agtggatcag ggacagattt cacactcaag 240

atcaccagag tggaggctga ggatctggga gtttatttct gctctcaaat tacacatttt 300

cctcccacgt tcggaggggg gaccaagcta gaaataaac gg 342

20 <210> 25
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25 <400> 25

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 26
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

ES 2 710 449 T3

<400> 26

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10

5

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 27

10

Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 28

Cys Ser Gln Ile Thr His Phe Pro Pro
1 5

20

<210> 29
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25

<400> 29

Cys Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
1 5 10 15

Gly Asp Gln Ala Ser Val Ser Cys Arg Ser Ser
20 25

30

<210> 30
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 30

ES 2 710 449 T3

Arg Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu
1 5 10

5 <210> 31
<211> 34
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 31

Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
1 5 10 15

Asp Phe Thr Leu Lys Ile Thr Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
20 25 30

Tyr Phe

10 <210> 32
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 32

ES 2 710 449 T3

Cys Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
 1 5 10 15

Gly Asp Gln Ala Ser Val Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His
 20 25 30

Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Arg Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80

Ile Thr Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln
 85 90 95

Ile Thr His Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg

5 <210> 33
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Descripción de desconocido: polinucleótido de región variable de cadena pesada de anticuerpo monoclonal 10H9

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(348)

<400> 33

ES 2 710 449 T3

```

gtg cag ctg ctg gaa tct gga cct gag ctg gtg aag cct gga gct tca      48
Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
1          5          10          15

atg aag ata tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act gac tac acc      96
Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Thr
          20          25          30

atg aac tgg gtg aag cag agc cat gga aag aac ctt gag tgg att gga      144
Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly
          35          40          45

ctt att aat cct tac aat ggt ttt act atc tat aat cag aag ttc aag      192
Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
          50          55          60

ggc aag gcc aca tta act gta gac aag tca tcc agc aca gcc tac atg      240
Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
65          70          75          80

gaa ctc ctc agt ctg aca tct gaa gac tct gca gtc tat tac ttt ata      288
Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Phe Ile
          85          90          95

aga gcg cat tac gac ggg aga gtt ttt tgg ggc caa ggc acc act ctc      336
Arg Ala His Tyr Asp Gly Arg Val Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
          100          105          110

aca gtc tcc tcg      348
Thr Val Ser Ser
          115

```

5 <210> 34
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Descripción de desconocido: polipéptido de región variable de cadena pesada de anticuerpo monoclonal 10H9

<400> 34

```

Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
1          5          10          15

Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Thr
          20          25          30

Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly
          35          40          45

```

10

ES 2 710 449 T3

Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Phe Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 50 55 60

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70 75 80

Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Phe Ile
 85 90 95

Arg Ala His Tyr Asp Gly Arg Val Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

- <210> 35
- <211> 342
- <212> ADN
- 5 <213> Desconocido
- <220>
- <223> Descripción de desconocido: polinucleótido de región variable de cadena ligera de anticuerpo monoclonal 10H9
- <220>
- 10 <221> CDS
- <222> (1)..(342)
- <400> 35

tgt gaa cta gtg atg acc cag tct cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt	48
Cys Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu	
1 5 10 15	
gga gat caa gcc tcc gtc tct tgc aga tct agt cag agc ctt gta cac	96
Gly Asp Gln Ala Ser Val Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His	
20 25 30	
agt aat gga aac acc tat tta cat cgg tac ctg cag aag cca ggc cag	144
Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Arg Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln	
35 40 45	
tct cca aag ctc ctg atc tac caa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc	192
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val	
50 55 60	
cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag	240
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys	
65 70 75 80	
atc acc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa	288
Ile Thr Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln	
85 90 95	
att aca cat ttt cct ccc acg ttc gga ggg ggg acc aag cta gaa ata	336
Ile Thr His Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile	
100 105 110	
aaa cgg	342
Lys Arg	

ES 2 710 449 T3

<210> 36
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Desconocido

5 <220>
 <223> Descripción de desconocido: polipéptido de región variable de cadena ligera de anticuerpo monoclonal 10H9

<400> 36

Cys Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
 1 5 10 15

Gly Asp Gln Ala Ser Val Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His
 20 25 30

Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Arg Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80

Ile Thr Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln
 85 90 95

Ile Thr His Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo aislado, que comprende una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26, una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 y una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28, en donde el anticuerpo aislado tiene una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID NO: 32.
- 10 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une con 25-hidroxivitamina D2 y 25-hidroxivitamina D3.
3. El anticuerpo de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo se une con 25-hidroxivitamina D2 y 25-hidroxivitamina D3 con afinidad similar.
4. Una célula aislada que expresa el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. Un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 15 6. El polinucleótido aislado de la reivindicación 5, en donde el polinucleótido es un ADNc.
7. Un polinucleótido aislado según la reivindicación 5, en donde el polinucleótido comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2, que codifica CDR1 de cadena pesada; la secuencia de la SEQ ID NO: 3, que codifica CDR2 de cadena pesada; y la secuencia de la SEQ ID NO: 4, que codifica CDR3 de cadena pesada y la secuencia de la SEQ ID NO: 18, que codifica CDR1 de cadena ligera; la secuencia de la SEQ ID NO: 19, que codifica CDR2 de cadena ligera; y la secuencia de la SEQ ID NO: 20, que codifica CDR3 de cadena ligera.
- 20 8. El polinucleótido aislado de la reivindicación 7, que comprende las SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 24.
9. Una célula de hibridoma que produce un anticuerpo que comprende una CDR1 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, una CDR2 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, una CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, una CDR1 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26, una CDR2 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 y una CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28 en donde el anticuerpo tiene una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la ID NO: 32.
- 25

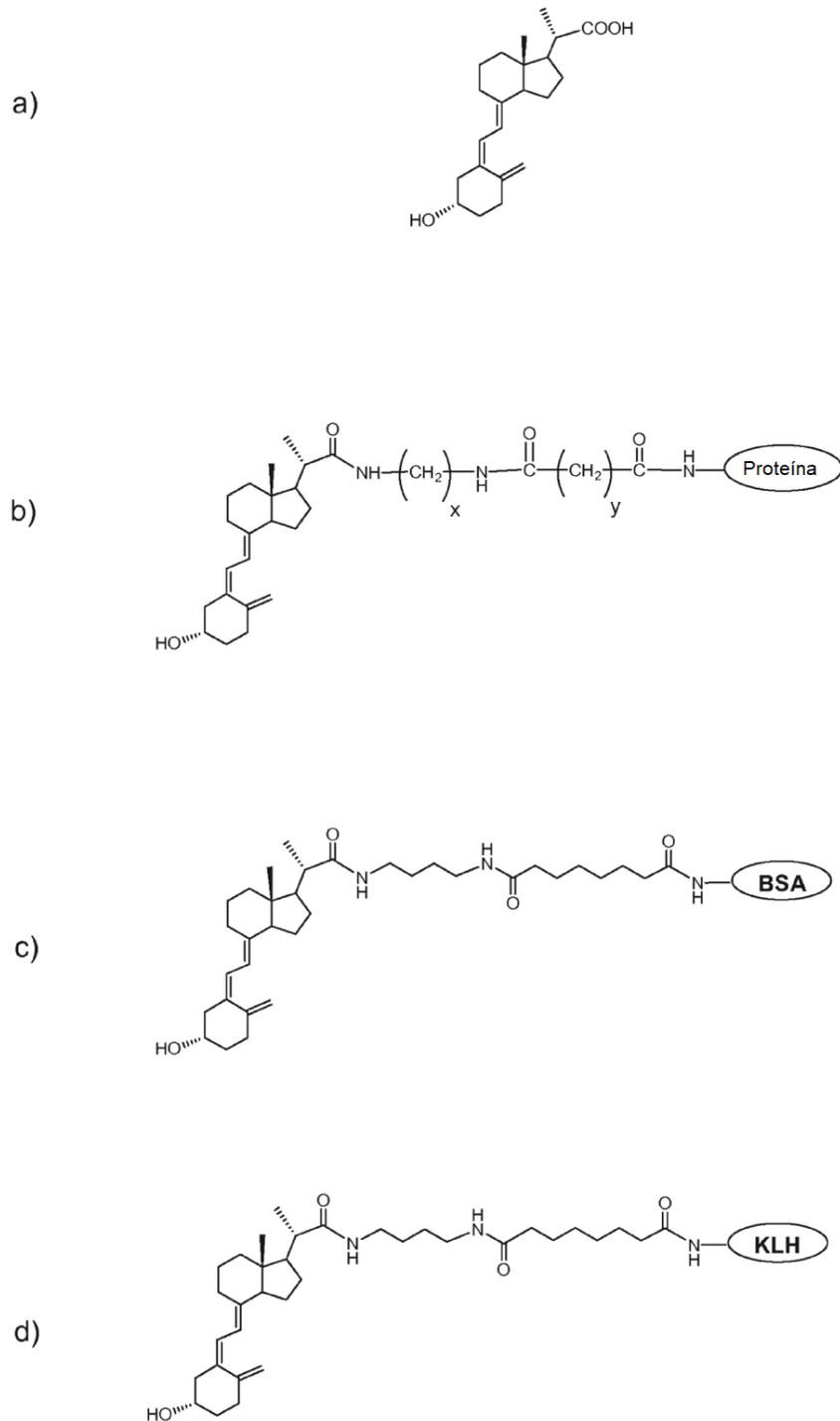


Figura 1

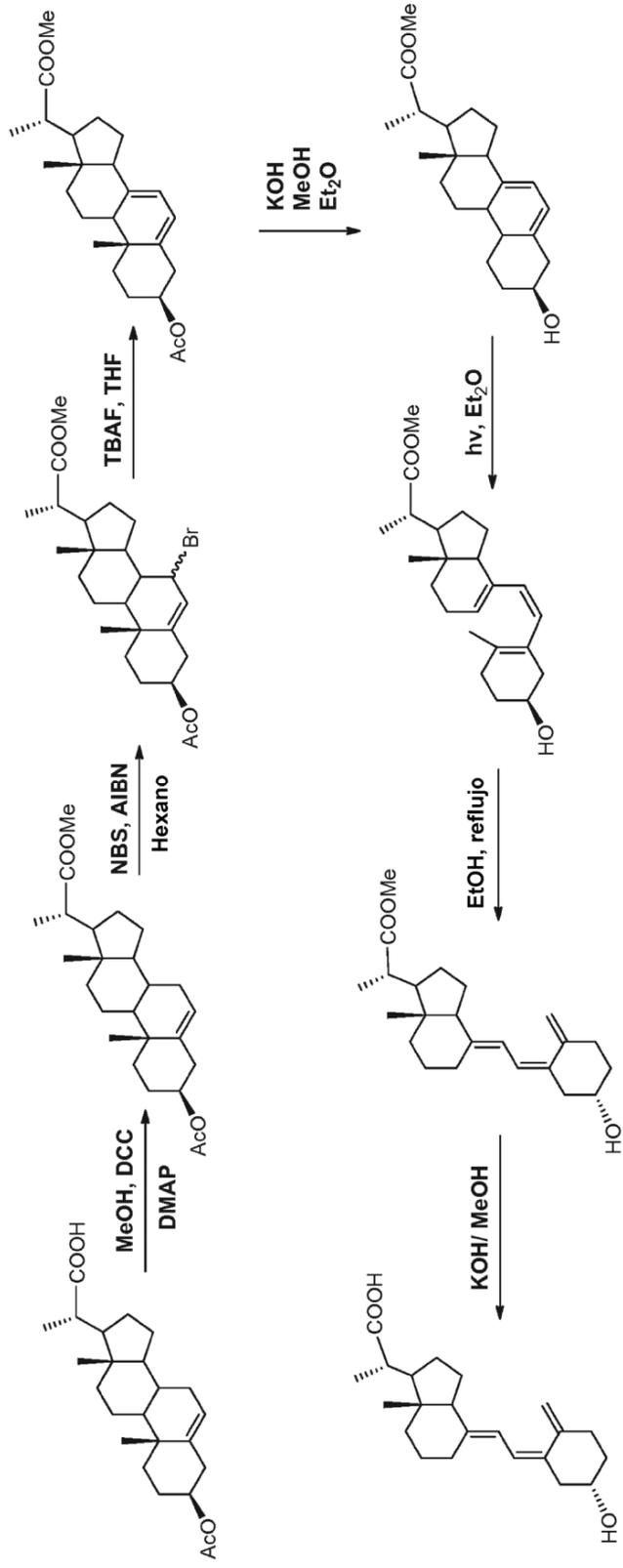


Figura 2

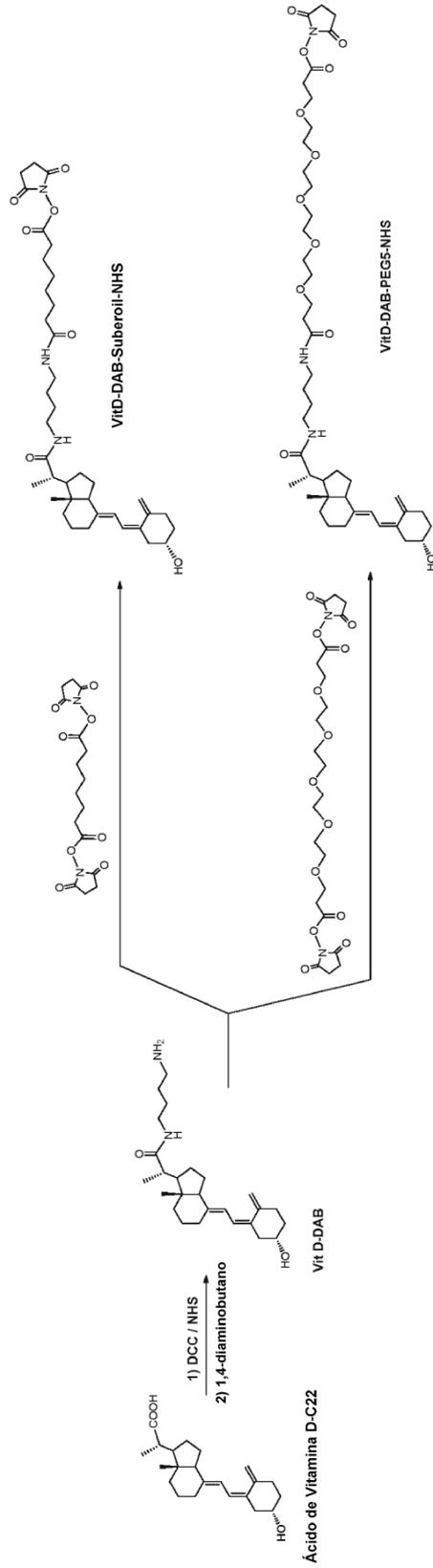


Figura 3

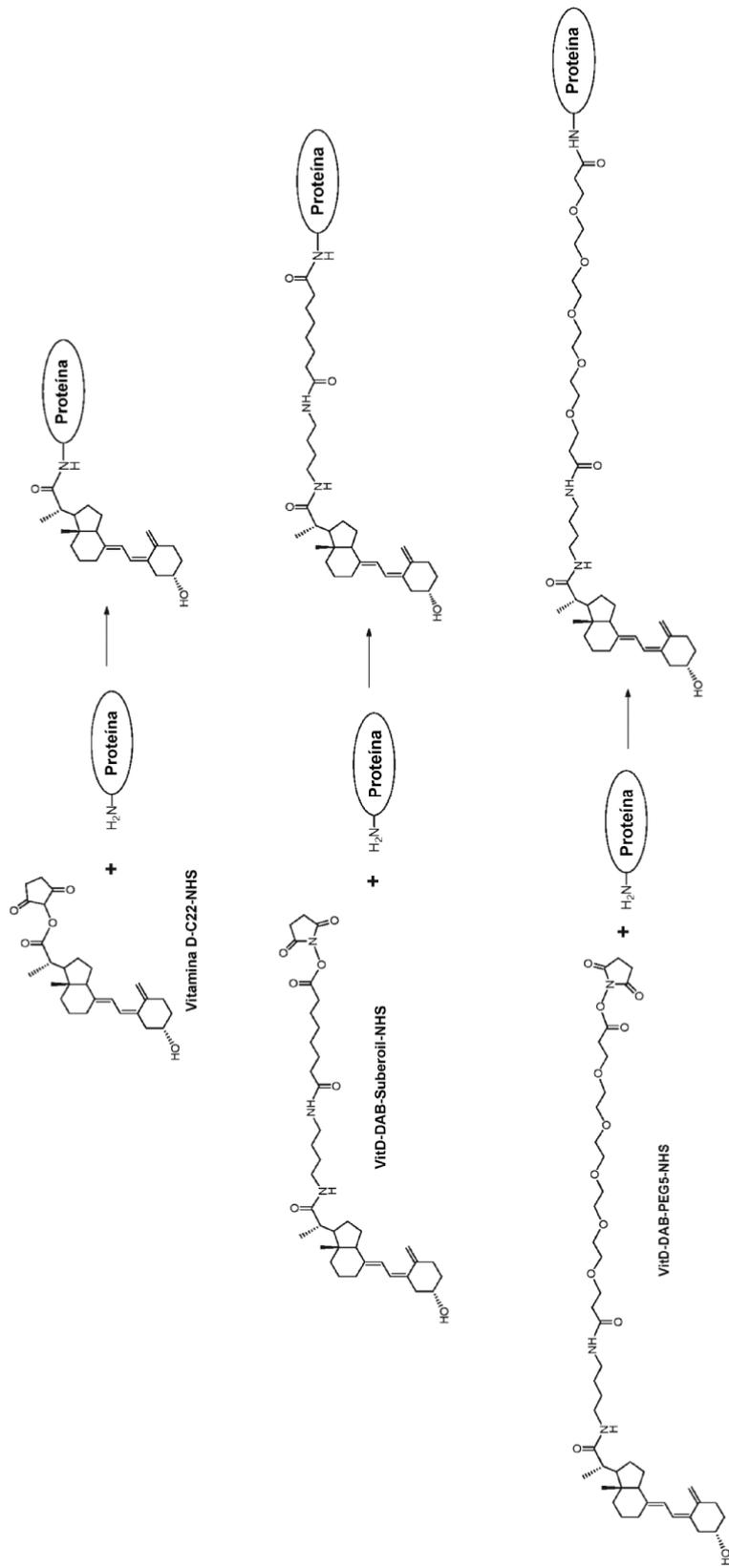


Figura 4

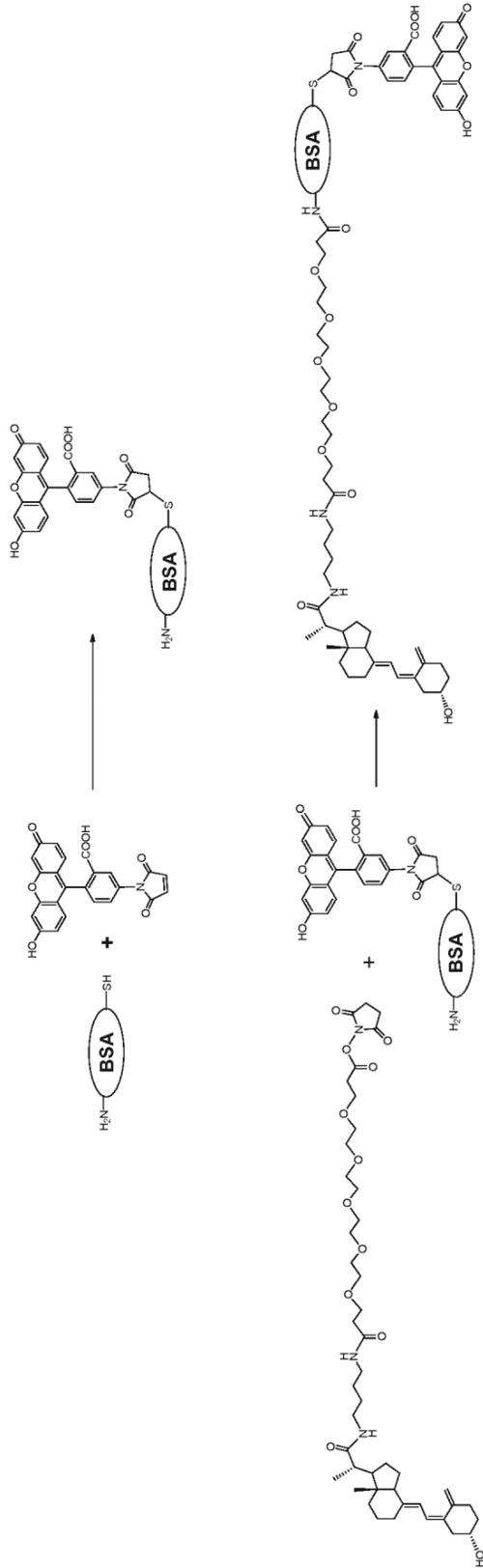


Figura 5

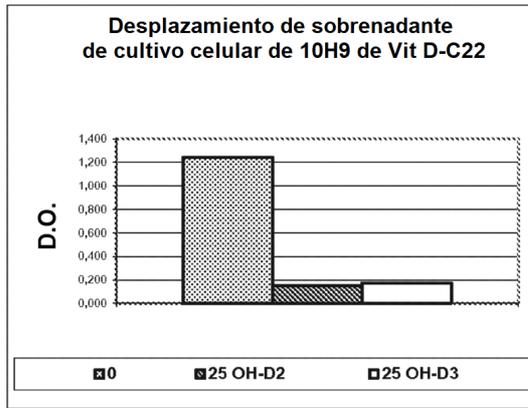


Figura 6

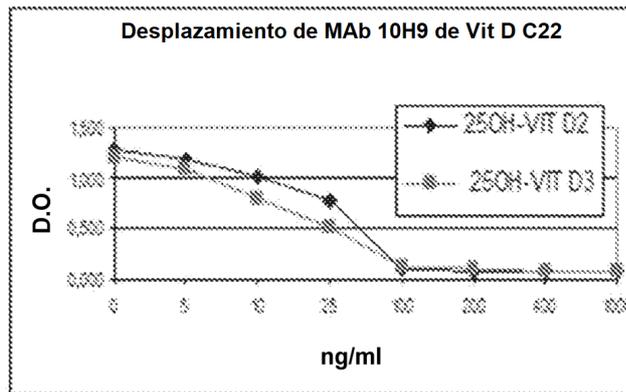
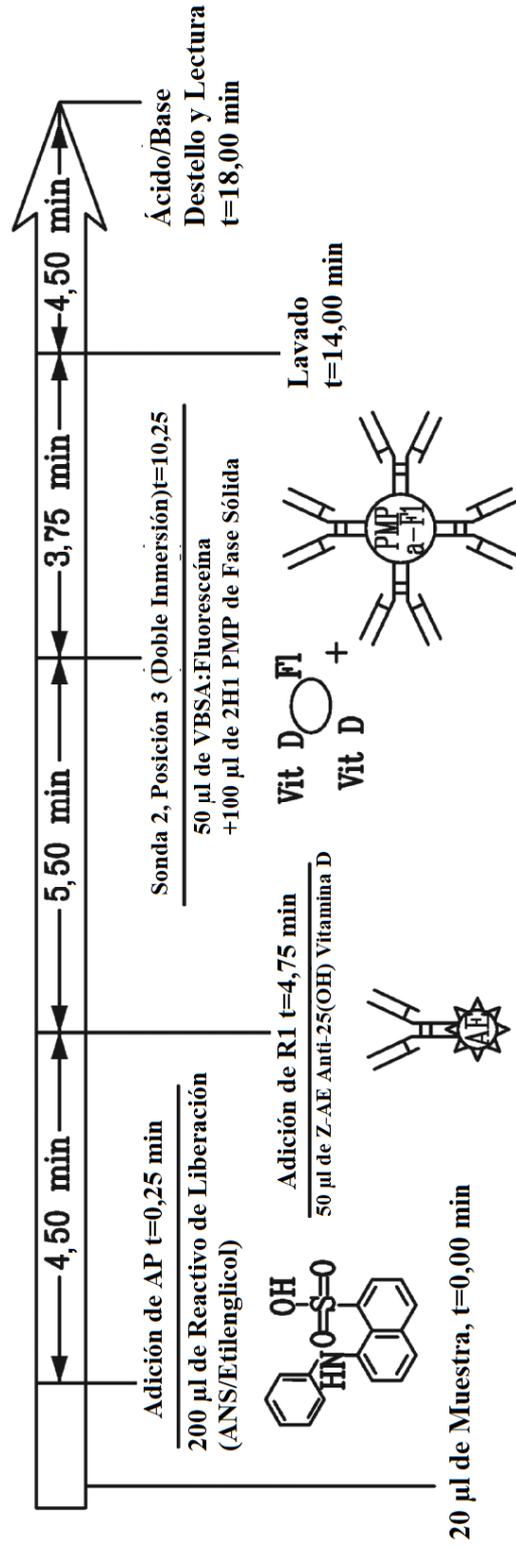


Figura 7

Esquema del Ensayo de Vitamina D Total ADVIA Centaur



25-hidroxi Vitamina D₃ 25-hidroxi Vitamina D₂

25(OH) Vitamina D en Muestra

Figura 8

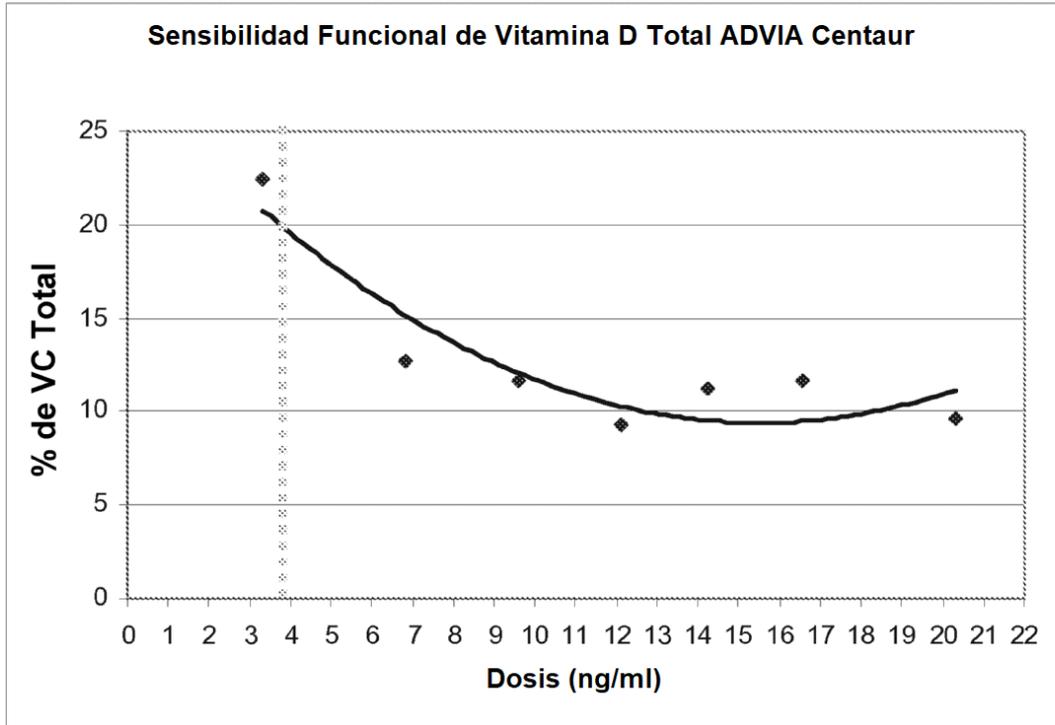


Figura 9

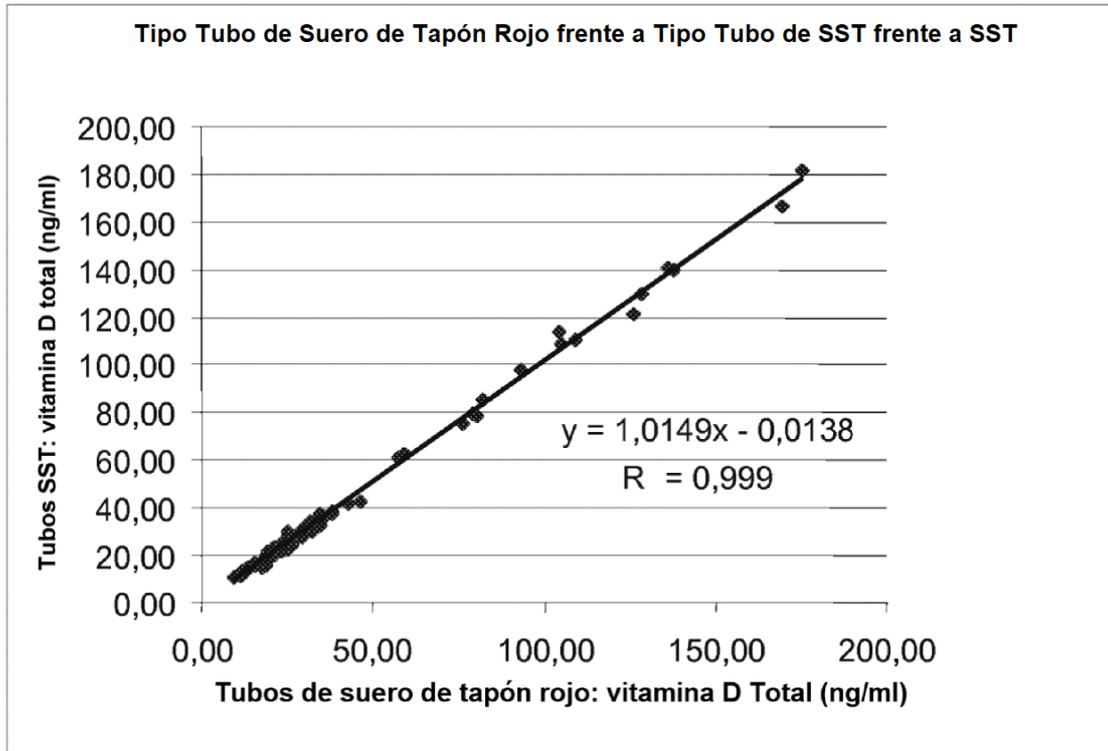


Figura 10

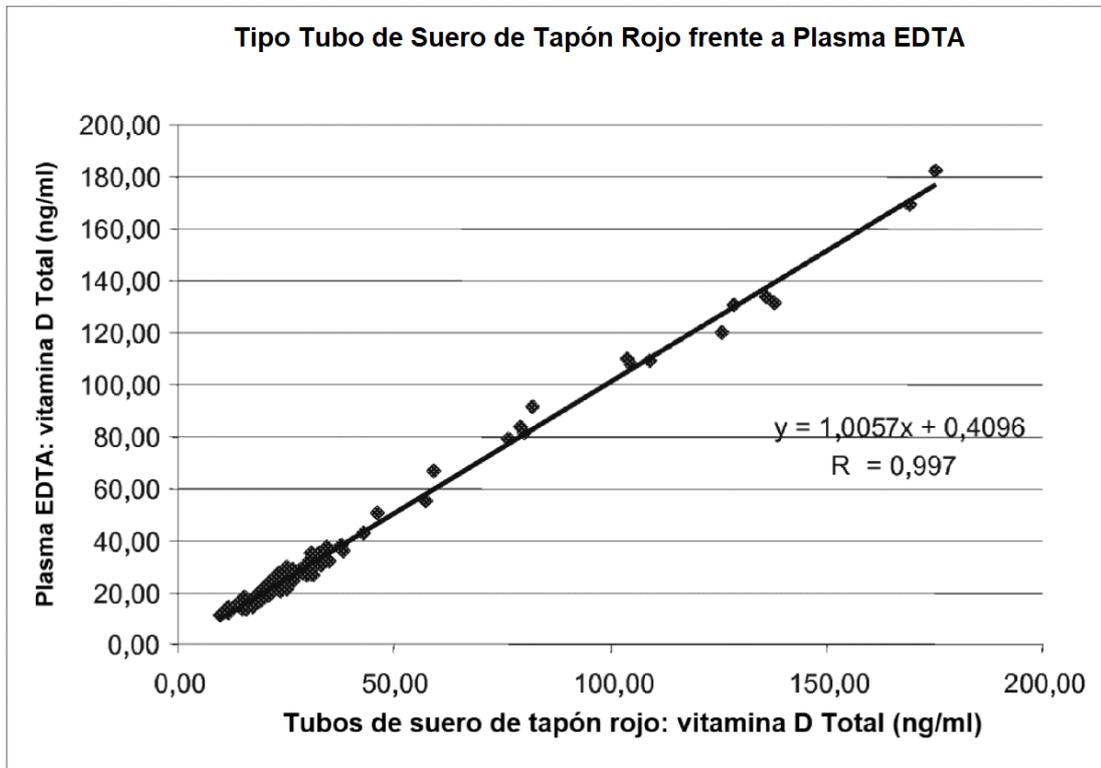


Figura 11

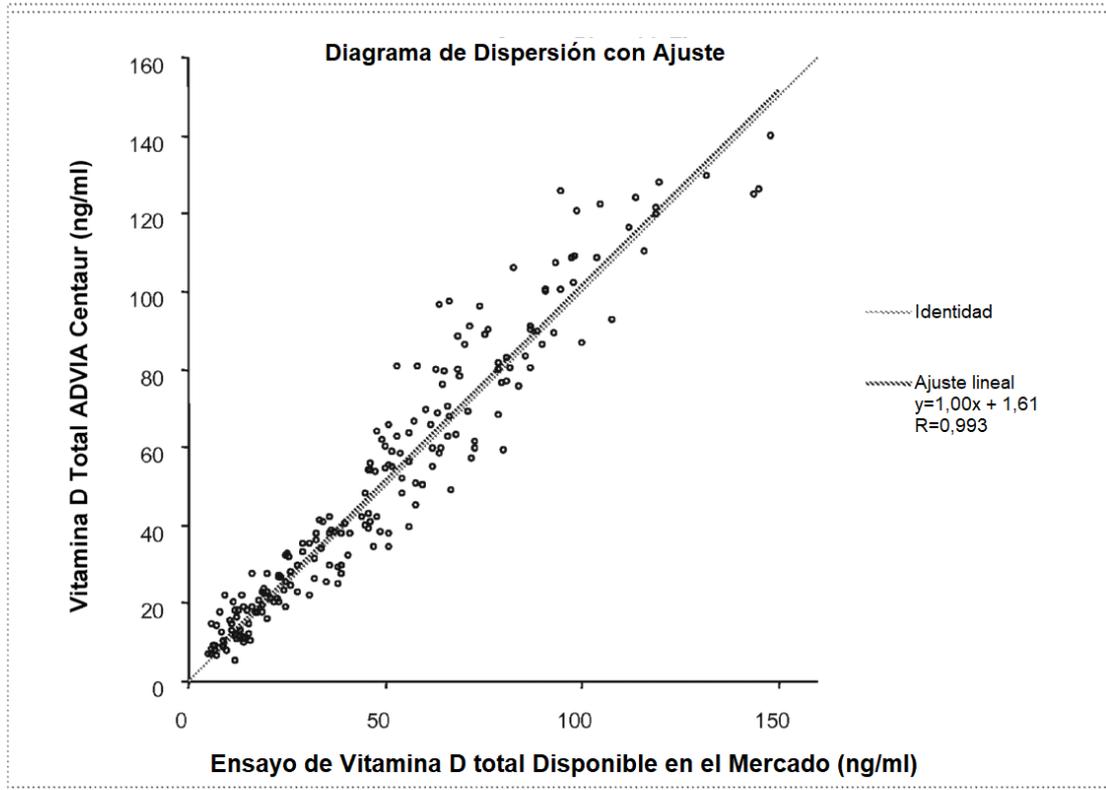


Figura 12

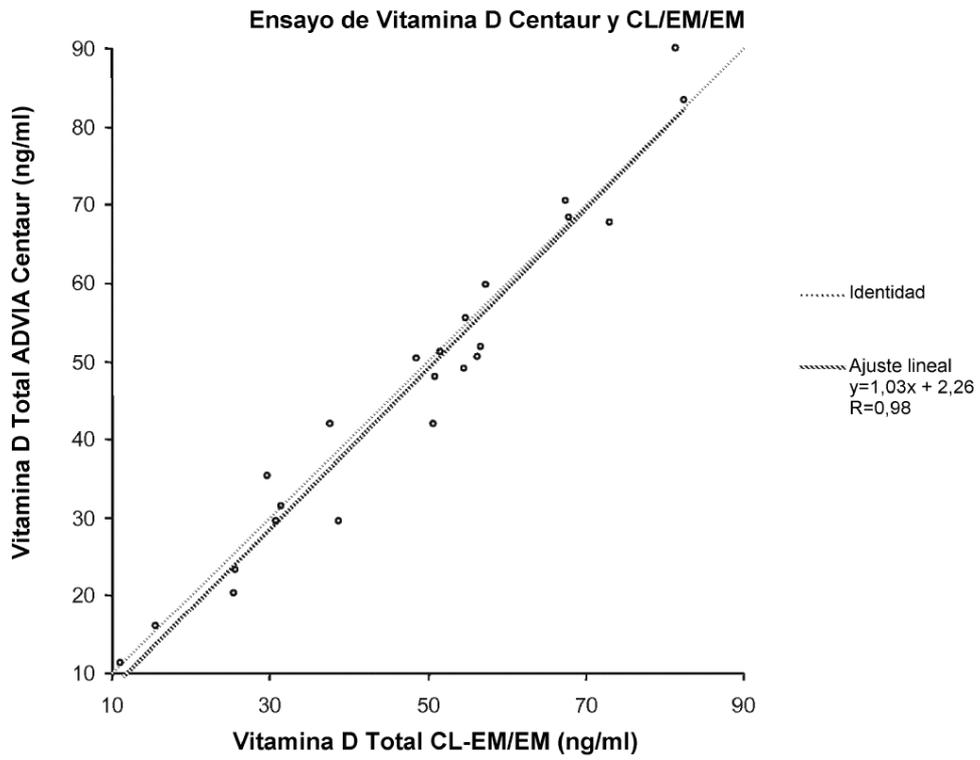


Figura 13

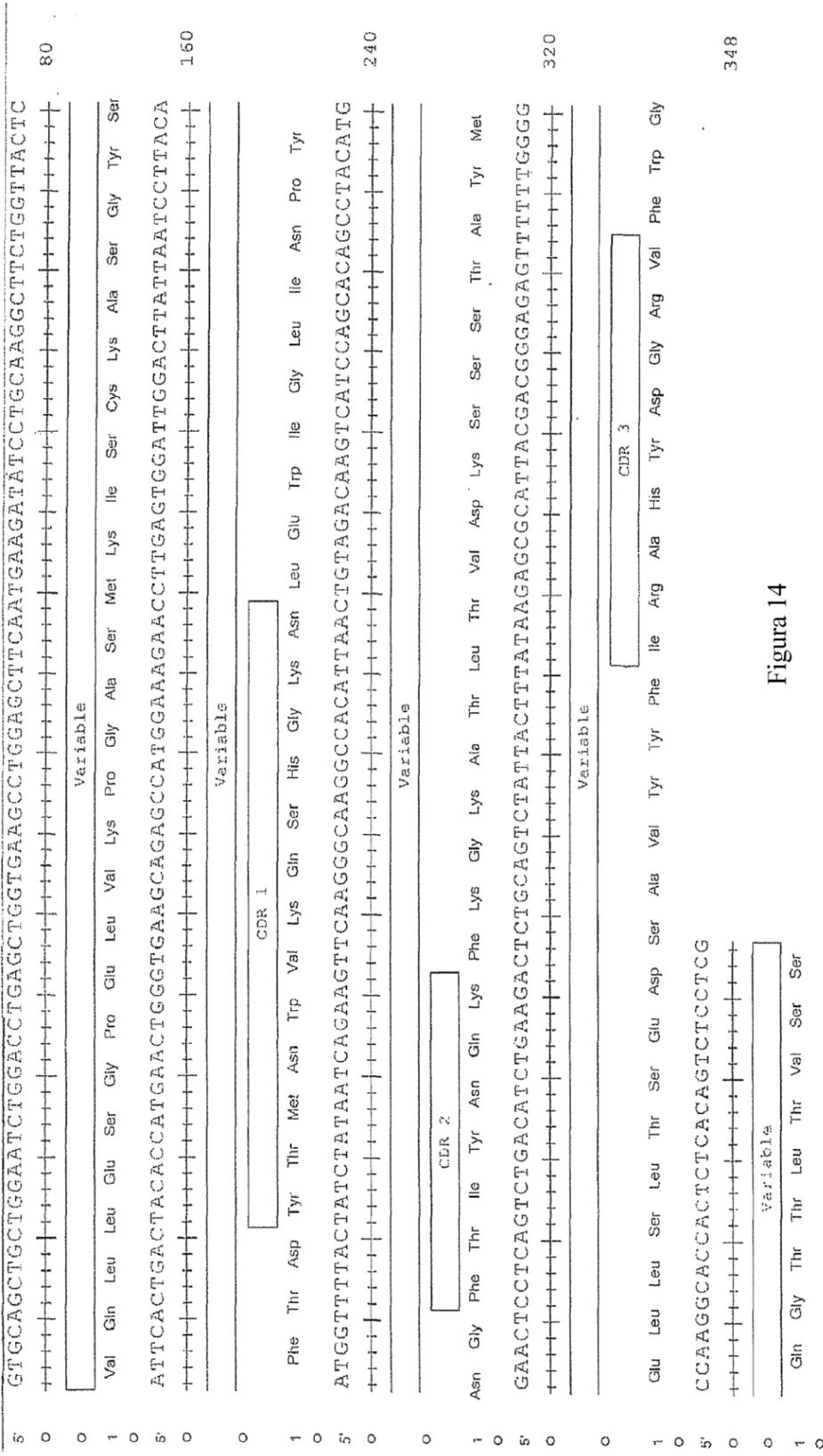


Figura 14

