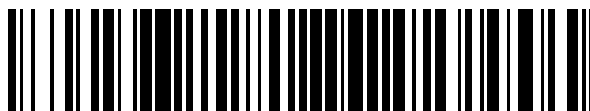


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 535**

51 Int. Cl.:

G01N 33/537 (2006.01)

G01N 33/541 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2015** **PCT/EP2015/078693**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2016** **WO16091755**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2015** **E 15804807 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019** **EP 3230739**

54 Título: **Procedimiento para la medición de vitamina D**

30 Prioridad:

08.12.2014 EP 14196778

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

21.06.2019

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)

Grenzacherstrasse 124

4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

FAATZ, ELKE;

GERG, MICHAEL;

JOSEL, HANS-PETER y

VOGL, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 717 535 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

Procedimiento para la medición de vitamina D

5 **Información sobre antecedentes**

La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para la medición de 25-hidroxivitamina D, en el que el compuesto potencialmente interferente 24,25-dihidroxivitamina D₃ se bloquea por un agente de unión que se une específicamente a 24,25-dihidroxivitamina D₃ y no se une a 25-hidroxivitamina D.

10 Un suministro adecuado de vitamina D es vital como ya sugiere el término "vitamina". Una carencia de vitamina D da lugar a enfermedades graves tales como raquitismo u osteoporosis. Aunque la vitamina D todavía se consideraba como una sustancia única a principios del siglo pasado, el sistema de vitamina D ha cambiado en el transcurso de las últimas décadas en una red compleja y diversa de metabolitos de la vitamina D. Hoy en día son conocidos más de 40 productos metabólicos de vitamina D diferentes (Zerwekh, J.E., Ann. Clin. Biochem. 41 (2004) 272-281).

15 Los seres humanos solo pueden producir vitaminas D₃ o calciferoles por la acción de los rayos ultravioleta de la luz solar sobre la piel. En la sangre, la vitamina D₃ se une a la denominada proteína de unión a la vitamina D y se transporta al hígado donde se convierte en 25-hidroxivitamina D₃ por 25-hidroxilación. Hoy en día se sabe que muchos otros tejidos están implicados en el metabolismo de la vitamina D además de la piel y el hígado, los dos órganos que ya se han mencionado (Schmidt-Gayk, H. *et al.* (eds.), "Calcium regulating hormones, vitamin D metabolites and cyclic AMP", Springer Verlag, Heidelberg (1990) pp. 24-47). 25-hidroxivitamina D y más específicamente 25-hidroxivitamina D₂ y 25-hidroxivitamina D₃ son la forma de almacenamiento principal de la vitamina D en el organismo humano con respecto a sus cantidades. Cuando sea necesario, estos precursores se pueden convertir en los riñones para formar la 1 α ,25-dihidroxivitamina D biológicamente activa, la denominada hormona D. La vitamina D biológicamente activa regula, entre otras, la absorción de calcio del intestino, la mineralización ósea e influye en un gran número de otras vías metabólicas tales como, por ejemplo, el sistema insulínico.

20 Medir el nivel de vitamina D en sí mismo es de poco beneficio cuando se determina el estado de vitamina D de un sujeto o paciente, ya que las concentraciones de vitamina D (vitamina D₂ y vitamina D₃) fluctúan mucho dependiendo de la absorción de alimentos o de la exposición a la luz solar. Además, la vitamina D tiene una semivida biológica relativamente corta en la circulación (24 horas) y, por lo tanto, por este motivo tampoco es un parámetro adecuado para determinar el estado de vitamina D de un paciente. También se aplica lo mismo a las formas fisiológicamente activas de la vitamina D (1,25-dihidroxivitamina D). Estas formas biológicamente activas también se producen en concentraciones relativamente pequeñas y altamente fluctuantes en comparación con 25-hidroxivitamina D. Por todos estos motivos, la cuantificación de 25-hidroxivitamina D en particular es un medio adecuado para analizar globalmente el estado de vitamina D total de un sujeto o paciente.

30 Los metabolitos de la vitamina D como 25-hidroxivitamina D se unen con alta afinidad por la proteína de unión a la vitamina D y, en menor medida, también a la albúmina y algunas lipoproteínas. Los procedimientos apropiados para liberar un metabolito de la vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D también serán, en circunstancias normales, más que apropiados para liberar un metabolito de la vitamina D también de cualquier otra proteína.

35 La unión de 25-hidroxivitamina D u otros compuestos de vitamina D a la proteína de unión a la vitamina D complica enormemente la determinación de los compuestos de vitamina D. Todos los procedimientos conocidos requieren que el compuesto de vitamina D que se va a analizar se libere o se separe del complejo que forma con la proteína de unión a la vitamina D. En lo sucesivo, esto se denomina la liberación de un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D por motivos de simplificación aunque, por supuesto, solo se puede liberar de un complejo de compuesto de vitamina D y proteína de unión a la vitamina D y no de la proteína de unión a la vitamina D sola.

40 La proteína de unión a la vitamina D se despliega a pH ácido, pero tiene una alta tendencia a replegarse correctamente y volver a unirse al analito cuando el pH se vuelve a desplazar a condiciones neutras. Por tanto, a menudo es necesario liberar en primer lugar los compuestos de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D y a continuación separar la proteína de unión a la vitamina D de los compuestos de vitamina D que se van a analizar.

45 Debido a la alta importancia clínica de la 25-hidroxivitamina D, son conocidos un gran número de procedimientos de la literatura que permiten que la 25-hidroxivitamina D se determine de forma más o menos fiable.

50 Haddad, J.G. *et al.*, J. Clin. Endocrinol. Metab. 33 (1971) 992-995, y Eisman, J.A. *et al.*, Anal. Biochem. 80 (1977) 298-305, por ejemplo, describen la determinación de las concentraciones de 25-hidroxivitamina D en muestras de sangre usando cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC).

55 Otros enfoques para la determinación de 25-hidroxivitamina D se basan, entre otros, en el uso de proteínas de unión a la vitamina D como las que están presentes en la leche. Por tanto, Holick, M.F. y Ray, R. (documento US

5.981.779) y DeLuca *et al.* (documento EP 0 583 945) describen ensayos de vitamina D para hidroxivitamina D y dihidroxivitamina D que se basan en la unión de estas sustancias a la proteína de unión a la vitamina D donde las concentraciones de estas sustancias se determinan por medio de un procedimiento de prueba competitivo. Sin embargo, un requisito previo de este procedimiento es que los metabolitos de la vitamina D que se van a determinar en primer lugar se deben aislar de las muestras de sangre o suero originales y se deben purificar, por ejemplo, por cromatografía.

Armbruster, F.P. *et al.* (documento WO 99/67211) enseñan que se debe preparar una muestra de suero o plasma para la determinación de vitamina D por precipitación con etanol. En este procedimiento, el precipitado de proteínas se retira por centrifugación y el sobrenadante etanólico contiene metabolitos de la vitamina D solubles. Estos se pueden medir en un ensayo de unión competitiva.

De forma alternativa, el documento EP 0 753 743 enseña que las proteínas se pueden separar de muestras de sangre o suero usando una sal de peryodato. En este caso, los compuestos de vitamina D se determinan en el sobrenadante sin proteínas a partir de las muestras tratadas con peryodato. En algunas pruebas comerciales, se recomienda el acetonitrilo para la extracción de la muestra de suero o plasma (por ejemplo, en el radioinmunoanálisis de DiaSorin o en la prueba de vitamina D de la empresa "Immundiagnostik").

En los últimos años, se propusieron una serie de reactivos de liberación diferentes que, en principio, deberían ser adecuados para liberar los compuestos de vitamina D de cualquier proteína de unión presente en la muestra. Sin embargo, esta liberación o separación se debe llevar a cabo en condiciones relativamente suaves, permitiendo así un uso directo de la muestra tratada con el reactivo de liberación en una prueba de unión (véase, por ejemplo, los documentos WO 02/57797 y US 2004/0132104). A pesar de los inmensos esfuerzos en los últimos años, todos los procedimientos disponibles para determinar la vitamina D tienen desventajas tales como preparación de muestras laboriosa, mala estandarización, mala concordancia entre los procedimientos de prueba o mala recuperación de vitamina D enriquecida (para esto véase en particular Zerwekh, J.E., *supra*).

En el documento US 7.087.395, se han usado hidróxidos de metales así como ciclodextrina y derivados de la misma, y salicilatos de metales para liberar los compuestos de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D, lo que da como resultado una desnaturalización irreversible de la proteína de unión a la vitamina D u otras proteínas séricas. Se han usado tensioactivos como Triton X100 o Tween-20 para evitar que el compuesto de vitamina D se una de forma inespecífica a lípidos y proteínas en la muestra después de la desnaturalización.

Es particularmente difícil automatizar una prueba para un compuesto de vitamina D. La automatización requiere resolver un problema muy difícil, es decir, sobrevivir en la cuerda floja: Por un lado, es necesario liberar los compuestos de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D con la ayuda de un reactivo de liberación adecuado, por otro lado, se deben seleccionar las condiciones de modo que la muestra se pueda analizar directamente de manera adicional. Un requisito previo de este análisis directo adicional es que, por un lado, la proteína de unión a la vitamina D endógena no se une o ya no se une de manera significativa a los compuestos de vitamina D durante este análisis y, por tanto, no interfiere con este análisis y, por otro lado, que el reactivo de liberación usado no interfiere con la unión de los reactivos de detección tales como anticuerpos o proteína de unión a la vitamina D. Además, se sabe que en la población humana están presentes diferentes alelos de la proteína de unión a la vitamina D que se comportan de manera bioquímicamente diferente. La liberación y medición de los compuestos de vitamina D debe ser comparable para diversos alelos/fenotipos.

Recientemente (documento WO 2011/144661) se puede realizar en línea un ensayo de vitamina D que usa un tratamiento de muestra apropiado, y sin precipitación/separación de cualquier proteína de unión a la vitamina D que pueda estar presente en la muestra. Este procedimiento se basa en el uso de reactivo liberador de vitamina D que contiene una sal de carbonato de hidrógeno y/o una sustancia que puede liberar iones de carbonato de hidrógeno (HCO_3^-) tras la hidrólisis en una concentración total de 0,1 M a 2,0 M, un agente reductor y un agente alcalinizante. Al usar este reactivo liberador, cualquier compuesto de vitamina D se libera de la proteína de unión a la vitamina D, mientras que al mismo tiempo la proteína de unión a la vitamina D comprendida en la muestra se inactiva y ya no se une más a la vitamina D. El compuesto de vitamina D liberado se puede medir por medios apropiados.

En muestras biológicas, están presentes muchos compuestos relacionados con la vitamina D que están estrechamente relacionados entre sí de forma estructural. 24,25-dihidroxivitamina D_3 está presente en cantidades bastante significativas en casi todas las muestras biológicas y no interfiere con la medición de 25-hidroxivitamina D. Su concentración depende de la cantidad total de 25-hidroxivitamina D en una muestra así como de los antecedentes clínicos de un individuo que da lugar a variaciones entre cohortes de pacientes con diferentes antecedentes medicinales. Se puede demostrar que es posible evitar la interferencia provocada por 24,25-dihidroxivitamina D_3 incubando una muestra con un agente de unión que se une a 24,25-dihidroxivitamina D_3 y no se une a 25-hidroxivitamina D.

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

En un modo de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para determinar la concentración de 25-hidroxivitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D₃, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) proporcionar una muestra obtenida de un sujeto,

b) mezclar la muestra

(ba) con un primer agente de unión que se une a 24,25-dihidroxivitamina D₃, formando de este modo un complejo entre el primer agente de unión y 24,25-dihidroxivitamina D₃;

(bb) con un segundo agente de unión que se une a 25-hidroxivitamina D, formando de este modo un complejo entre el segundo agente de unión y 25-hidroxivitamina D;

c) medir el complejo formado en (bb), determinando de este modo la concentración de 25-hidroxivitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D₃.

En otro modo de realización la presente invención se refiere al uso del/de los procedimiento(s) de acuerdo con la presente invención para determinar la concentración de 25-hidroxivitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D₃.

La presente invención se refiere además en un modo de realización al uso de un primer agente de unión que se une a 24,25-dihidroxivitamina D₃ y un segundo agente de unión que se une a 25-hidroxivitamina D en procedimiento(s) *in vitro* de acuerdo con la presente invención para determinar la concentración de 25-hidroxivitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D₃ en una muestra obtenida de un sujeto.

De acuerdo con otro modo de realización, la presente invención se refiere a un kit para realizar el/los procedimiento(s) de acuerdo con la presente invención que comprende al menos

a) un primer agente de unión que se une a 24,25-dihidroxivitamina D₃, en el que el primer agente de unión es un anticuerpo monoclonal o una parte funcionalmente activa del anticuerpo monoclonal, y

b) un segundo agente de unión que se une a 25-hidroxivitamina D, en el que el segundo agente de unión es una proteína de unión a la vitamina D.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la cantidad total y/o concentración de 25-hidroxivitamina D en presencia de un agente de unión que se une a 25-hidroxivitamina D así como kits, composiciones y usos relativos de las mismas.

En un modo de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para determinar la concentración de 25-hidroxivitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D₃, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) proporcionar una muestra obtenida de un sujeto,

b) mezclar la muestra

(ba) con un primer agente de unión que se une a 24,25-dihidroxivitamina D₃, formando de este modo un complejo entre el primer agente de unión y 24,25-dihidroxivitamina D₃;

(bb) con un segundo agente de unión que se une a 25-hidroxivitamina D, formando de este modo un complejo entre el segundo agente de unión y 25-hidroxivitamina D;

c) medir el complejo formado en (bb), determinando de este modo la concentración de 25-hidroxivitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D₃.

Los artículos "un/uno" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo.

La expresión "uno o más" indica de 1 a 50, preferentemente de 1 a 20, también es preferente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 o 15.

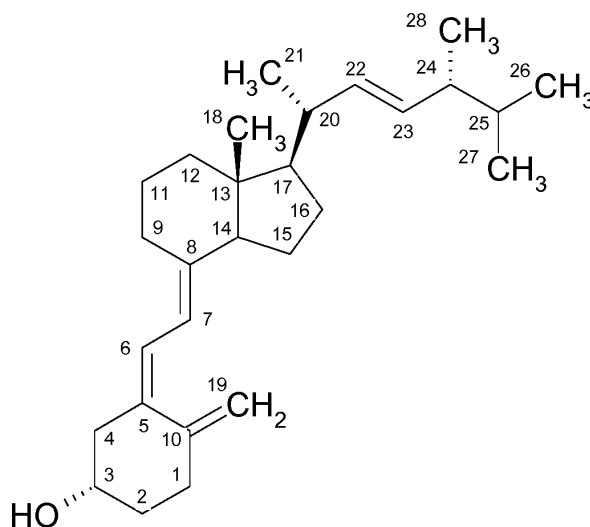
El término "detección" se refiere a la detección cualitativa o cuantitativa de un analito en una muestra para

determinar la cantidad y/o concentración del analito, en el presente documento las mediciones de un analito tal como 25-hidroxivitamina D. "Detección" incluye cualquier medio de detección, incluyendo detección directa e indirecta.

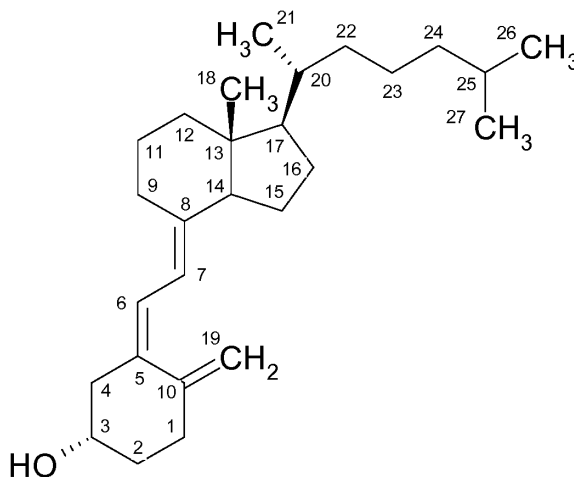
El término "determinar" se usa aquí para la detección tanto cualitativa como cuantitativa de un analito en una muestra, y puede incluir la determinación de la cantidad y/o concentración del analito. El término también cubre la identificación y/o cualquier caracterización de un analito en base a parámetros físicos.

Si no se establece de otro modo, el término "25-hidroxivitamina D" o "compuesto de vitamina D" se debe entender que incluye todos los compuestos naturales que contienen la cadena principal de vitamina D₂ o la cadena principal de vitamina D₃ de acuerdo con las siguientes fórmulas estructurales I y II.

Fórmula I



Fórmula II



En las fórmulas estructurales I y II, las posiciones de la vitamina D se establecen de acuerdo con la nomenclatura de esteroides. La 25-hidroxivitamina D indica metabolitos de la vitamina D que están hidroxilados en la posición 25 de las fórmulas estructurales I y II, es decir, la 25-hidroxivitamina D₂ así como la 25-hidroxivitamina D₃. Los compuestos de hidroxivitamina D conocidos adicionales son, por ejemplo, las formas 1,25-dihidroxivitamina D y 24,25-dihidroxivitamina D.

1,25-dihidroxivitamina D se refiere a las formas activas de la vitamina D (las denominadas hormonas D) que tienen una hidroxilación en la posición 1, así como en la posición 25 de las fórmulas estructurales I y II.

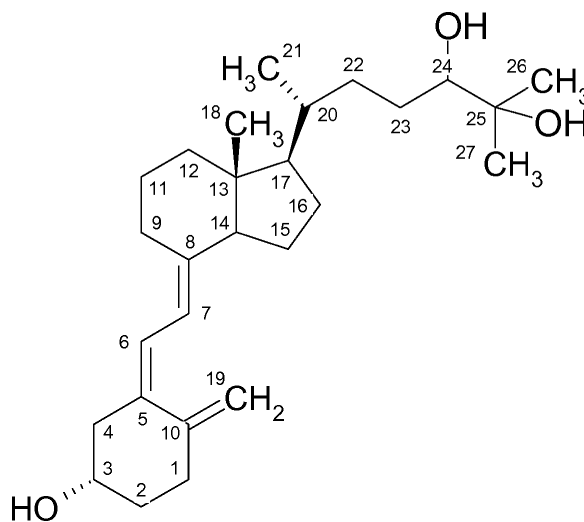
Otros compuestos de vitamina D bien conocidos son 24,25-dihidroxivitamina D₂, 24,25-dihidroxivitamina D₃ y 3-epi-25-hidroxivitamina D.

En un modo de realización de acuerdo con la presente invención, la 25-hidroxitamina D se selecciona del grupo que consiste en 25-hidroxitamina D₂, 25-hidroxitamina D₃, 24,25-dihidroxitamina D₂, 24,25-dihidroxitamina D₃ y 3-epi-25-hidroxitamina D. En un modo de realización preferente, la 25-hidroxitamina D se selecciona del grupo que consiste en 25-hidroxitamina D₂ y 25-hidroxitamina D₃.

24,25-dihidroxitamina D₃ está presente en cantidades bastante significativas en casi todas las muestras biológicas y no interfiere con la medición de 25-hidroxitamina D. Su concentración depende de la cantidad total de 25-hidroxitamina D en una muestra así como de los antecedentes clínicos de un individuo que da lugar a variaciones entre cohortes de pacientes con diferentes antecedentes medicinales. Se puede demostrar que es posible evitar la interferencia provocada por 24,25-dihidroxitamina D₃ incubando una muestra con un agente de unión que se une a 24,25-dihidroxitamina D₃ y no se une a 25-hidroxitamina D.

Si no se establece de otro modo, el término "24,25-dihidroxitamina D" se debe entender que incluye todos los compuestos naturales que contienen la cadena principal de vitamina D₃ y un grupo OH en el átomo de carbono 24 y 25, respectivamente, de acuerdo con la siguiente fórmula estructural III. En un modo de realización de acuerdo con la presente invención, la 24,25-dihidroxitamina D es 24,25-dihidroxitamina D₃ (24(R),25-(OH)₂D₃).

Fórmula III



La muestra que comprende el/los analito(s) (por ejemplo 25-hidroxitamina D, 24,25-dihidroxitamina D₃) puede ser una composición líquida, gel o licuable, preferentemente un líquido. Dicho líquido puede ser una solución, suspensión o emulsión. En particular, la muestra es una muestra biológica, en particular una muestra corporal obtenida de un ser humano o animal, o mezclas de las mismas. Dicha muestra corporal se puede usar directamente después de su recuperación de un sujeto, o se puede almacenar en condiciones adecuadas, por ejemplo por congelación, para realizar el procedimiento de la invención en un punto temporal previsto. En particular, se pueden medir muestras de diversos sujetos y/o diferentes puntos temporales para comparar sujetos o para supervisar un tratamiento. La recuperación de una muestra corporal se puede realizar por un experto dependiendo de la muestra. En un modo de realización preferente, la muestra es sangre, suero o plasma. Todavía en otro modo de realización, la muestra es sangre o suero sanguíneo. En dicho caso, se extrae sangre de un sujeto. Se puede obtener suero sanguíneo de sangre por procedimientos conocidos en la técnica. De forma similar, se pueden obtener otras muestras corporales, por ejemplo, recoger orina, o tomar una biopsia, y por otro tratamiento de la muestra, si es necesario.

Como se describe anteriormente, la muestra comprende el/los analito(s) 25-hidroxitamina D y 24,25-dihidroxitamina D₃, respectivamente.

"Miembro de par de unión" se refiere a un miembro de un par de unión ("bp"), lo que quiere decir dos moléculas diferentes en las que una de las moléculas se une con la segunda molécula a través de medios químicos o físicos. Además de los miembros del par de unión de antígeno y anticuerpo, otros pares de unión incluyen, como ejemplos sin limitación, biotina y avidina, carbohidratos y lectinas, secuencias nucleotídicas complementarias, secuencias peptídicas complementarias, moléculas efectoras y receptoras, cofactores enzimáticos y enzimas, inhibidores enzimáticos y enzimas, una secuencia peptídica o resto químico (tal como digoxina/antidigoxina) y un anticuerpo específico para la secuencia, resto químico o toda la proteína, ácidos y bases poliméricas, tintes y los correspondientes fijadores de proteínas, péptidos y fijadores de proteínas específicos (por ejemplo, ribonucleasa S-péptido y ribonucleasa S-proteína), metales y sus quelantes, aptámeros, y similares. Además, los pares de unión pueden incluir un miembro que es un análogo de un miembro de unión original, por ejemplo un analito-análogo o por

ejemplo un miembro de unión preparado por técnicas recombinantes o ingeniería molecular que es análogo al miembro del par de unión original y tiene las mismas propiedades de unión.

Un miembro del par de unión es análogo a un miembro del par de unión si ambos se pueden unir al miembro complementario del par de unión de la misma forma. Dicho miembro del par de unión puede ser, por ejemplo, un ligando o bien un receptor que se ha modificado por el reemplazo de al menos un átomo de hidrógeno por un grupo para proporcionar, por ejemplo, un ligando marcado o receptor marcado. Los miembros del par de unión pueden ser análogos al analito o al miembro del par de unión que es complementario al analito.

Un "agente de unión" es un miembro de un par de unión ("bp") que se une al otro miembro del par de unión, la correspondiente molécula diana, por ejemplo 24,25-dihidroxitamina D₃. La afinidad (K_d) de un agente de unión es de 10⁻⁷ mol/l por su correspondiente molécula diana. Un agente de unión tiene preferentemente una afinidad de 10⁻⁸ mol/l. Además preferente, un agente de unión tiene una afinidad de 10⁻⁹ mol/l por su molécula diana. Incluso más preferente, un agente de unión tiene una afinidad de 10⁻¹⁰ mol/l por su molécula diana.

Como apreciará el experto en la técnica, el término "primer agente de unión" que se une a 24,25-dihidroxitamina D₃ se usa para indicar que otras biomoléculas presentes en la muestra no se unen significativamente al agente de unión específico para 24,25-dihidroxitamina D₃. Preferentemente, el nivel de unión del agente de unión específico a una biomolécula distinta de la molécula diana da como resultado una afinidad de unión que es solo un 10 % o menos, preferentemente solo un 5 % o menos, respectivamente, de la afinidad por la molécula diana. Un primer agente de unión preferente que se une a 24,25-dihidroxitamina D₃ cumplirá tanto los criterios mínimos anteriores para la afinidad así como para la especificidad.

Un "primer agente de unión" de acuerdo con la presente invención en un modo de realización se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal y anticuerpo sintético (anticuerpo plástico), preferente, un anticuerpo monoclonal o anticuerpo sintético, además preferente, un anticuerpo monoclonal o una parte funcionalmente activa del anticuerpo monoclonal, respectivamente. El primer agente de unión se une en un modo de realización a 24,25-dihidroxitamina D, además preferente, el primer agente de unión se une a 24,25-dihidroxitamina D₃. Preferentemente el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que se une a 24,25-dihidroxitamina D₃. Además preferente, el anticuerpo es un anticuerpo plástico que se une a 24,25-dihidroxitamina D₃.

Un "anticuerpo plástico" de acuerdo con la presente invención es una nanopartícula polimérica sintética con una función similar a anticuerpo (Hoshino, Y. *et al.*, J. Mater. Chem., 2011, 21, 3517-3521). Un anticuerpo plástico de acuerdo con la presente invención se puede unir y neutralizar 24,25-dihidroxitamina D₃ específica.

Un "segundo agente de unión" de acuerdo con la presente invención es en un modo de realización una proteína de unión a la vitamina D (VitD-BP) o un anticuerpo o una parte funcionalmente activa del anticuerpo, que se une a 25-hidroxitamina D. Además preferente, el segundo agente de unión es una proteína de unión a la vitamina D, preferente, una proteína de unión a la vitamina D recombinante. Todavía en otro modo de realización el segundo agente de unión es una parte funcionalmente activa de la proteína de unión a la vitamina D, preferentemente el dominio I de la proteína de unión a la vitamina D.

En los ejemplos de la presente invención, el anticuerpo mAb<24,25-dihidroxitamina D₃>rK-IgG se usó con éxito como primer agente de unión. En un modo de realización preferente, el primer agente de unión es mAb<24,25-dihidroxitamina D₃>rK-IgG.

Los anticuerpos naturales son proteínas plasmáticas globulares (~150 kDa (http://en.wikipedia.org/wiki/Dalton_unit)) que también son conocidas como inmunoglobulinas que comparten una estructura básica. Puesto que tienen cadenas glucídicas añadidas a residuos aminoácidos, son glucoproteínas. La unidad funcional básica de cada anticuerpo es un monómero de inmunoglobulina (Ig) (que contiene solo una unidad de Ig); los anticuerpos secretados también pueden ser dímeros con dos unidades de Ig como con IgA, tetrámeros con cuatro unidades de Ig como IgM de peces teleósteos, o pentámeros con cinco unidades de Ig, como IgM de mamífero. En la presente invención, los ejemplos de formatos adecuados incluyen el formato de anticuerpos naturales que incluyen isotipos de anticuerpos conocidos como IgA, IgD, IgE, IgG y IgM.

El monómero de Ig es una molécula con forma de "Y" que consiste en cuatro cadenas polipeptídicas; dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas conectadas por enlaces disulfuro entre residuos de cisteína. Cada cadena pesada es de aproximadamente 440 aminoácidos de longitud; cada cadena ligera es de aproximadamente 220 aminoácidos de longitud. Las cadenas pesadas y ligeras contienen cada una enlaces disulfuro intracatenarios que estabilizan su plegamiento. Cada cadena se compone de dominios estructurales llamados dominios de Ig. Estos dominios contienen aproximadamente 70-110 aminoácidos y se clasifican en diferentes categorías (por ejemplo, variable o V, y constante o C) de acuerdo con su tamaño y función. Tienen un pliegue de inmunoglobulina característico en el que dos láminas beta crean una conformación "sándwich", mantenidas juntas por interacciones entre cisteínas conservadas y otros aminoácidos cargados.

Existen cinco tipos de cadena pesada de Ig de mamífero indicadas por α , δ , ϵ , γ y μ . El tipo de cadena pesada presente define el isotipo del anticuerpo; estas cadenas se encuentran en los anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente.

Las distintas cadenas pesadas difieren en tamaño y composición; α y γ contienen aproximadamente 450 aminoácidos y δ aproximadamente 500 aminoácidos, mientras que μ y ϵ tienen aproximadamente 550 aminoácidos. Cada cadena pesada tiene dos regiones, la región constante (CH) y la región variable (VH). En una especie, la región constante es idéntica en todos los anticuerpos del mismo isotipo, pero difiere en anticuerpos de isotipos diferentes. Las cadenas pesadas γ , α y δ tienen una región constante compuesta de tres dominios de Ig en tándem, y una región bisagra para flexibilidad añadida; las cadenas pesadas μ y ϵ tienen una región constante compuesta de cuatro dominios de inmunoglobulina. La región variable de la cadena pesada difiere en los anticuerpos producidos por diferentes linfocitos B, pero es el mismo para todos los anticuerpos producidos por un único linfocito B o clon de linfocito B. La región variable de cada cadena pesada es de aproximadamente 110 aminoácidos de largo y se compone de un único dominio de Ig.

En mamíferos existen dos tipos de cadena ligera de inmunoglobulina indicados por λ y κ . Una cadena ligera tiene dos dominios sucesivos: un dominio constante (CL) y un dominio variable (VL). La longitud aproximada de una cadena ligera es de 211 a 217 aminoácidos. Cada anticuerpo contiene dos cadenas ligeras que son siempre idénticas; solo un tipo de cadena ligera, κ o λ , está presente por anticuerpo en mamíferos. Otros tipos de cadenas ligeras, tales como la cadena ι , se encuentran en vertebrados inferiores como *Chondrichthyes* y *Teleostei*.

Además de los anticuerpos naturales, se han desarrollado formatos de anticuerpos artificiales que incluyen fragmentos de anticuerpos. Algunos de ellos se describen a continuación.

Aunque la estructura general de todos los anticuerpos es muy similar, la propiedad única de un anticuerpo dado se determina por las regiones variables (V), como se detalla anteriormente. Más específicamente, los bucles variables, tres cada uno en la cadena ligera (VL) y tres en la pesada (VH), son responsables de la unión al antígeno, es decir, por su especificidad por el antígeno. Estos bucles se denominan regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Debido a que las CDR de ambos dominios VH y VL contribuyen al sitio de unión a antígeno, es la combinación de las cadenas pesadas y ligeras, y no de cualquiera sola, lo que determina la especificidad por antígeno final.

En consecuencia, el término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, quiere decir cualquier polipéptido que tiene similitud estructural con un aminoácido natural y se puede unir específicamente a la respectiva diana, en el que la especificidad de unión se determina por las CDR. Por tanto, se pretende que "anticuerpo" se refiera a una estructura derivada de inmunoglobulina con unión a la respectiva diana que incluye, pero no se limita a, un anticuerpo de longitud completa o completo, un fragmento de unión a antígeno (un fragmento derivado, física o conceptualmente, de una estructura de anticuerpo), un derivado de cualquiera de los anteriores, una molécula quimérica, una fusión de cualquiera de los anteriores con otro polipéptido, o cualquier estructura/composición alternativa que se una selectivamente a la respectiva diana. El anticuerpo o partes funcionalmente activas del mismo puede ser cualquier polipéptido que comprende al menos un fragmento de unión a antígeno. Los fragmentos de unión a antígeno consisten en al menos el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera, dispuestos de manera que ambos dominios conjuntamente se puedan unir al antígeno específico. La "respectiva diana" es el analito en el caso de la molécula de captura, la molécula de unión y la molécula de detección, y es la molécula de unión en el caso del anticuerpo antiidiotipo como molécula de atrapamiento preferente.

Anticuerpos "de longitud completa" o "completos" se refieren a proteínas que comprenden dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro que comprenden: (1) en términos de las cadenas pesadas, una región variable y una región constante de la cadena pesada que comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3; y (2) en términos de las cadenas ligeras, una región variable de la cadena ligera y una región constante de la cadena ligera que comprende un dominio, CL. Con respecto al término "anticuerpo completo", quiere decir cualquier anticuerpo que tiene una estructura de dominio global típica de un anticuerpo natural (es decir, que comprende una cadena pesada de tres o cuatro dominios constantes y una cadena ligera de un dominio constante así como los respectivos dominios variables), incluso aunque cada dominio pueda comprender otras modificaciones, tales como mutaciones, deleciones o inserciones, que no cambian la estructura de dominio global.

Las "partes funcionalmente activas de anticuerpos" o "fragmentos de anticuerpos" también contienen al menos un fragmento de unión a antígeno como se define anteriormente, y presentan esencialmente la misma función y especificidad de unión que el anticuerpo completo del que se deriva la parte funcionalmente activa (o fragmento). La digestión proteolítica limitada con papaína escinde el prototipo de Ig en tres fragmentos. Dos fragmentos aminoterminalmente idénticos, que contiene cada uno una cadena L entera y aproximadamente la mitad de una cadena H, son los fragmentos de unión a antígeno (Fab). El tercer fragmento, similar en tamaño pero que contiene la mitad carboxilo terminal de ambas cadenas pesadas con su enlace disulfuro intercatenario, es el fragmento cristalizante (Fc). El Fc contiene carbohidratos, sitios de unión al complemento y sitios de unión a FcR. La digestión con pepsina limitada proporciona un único fragmento F(ab')₂ que contiene ambas piezas de Fab y la región bisagra, incluyendo el

enlace disulfuro intercatenario H-H. F(ab')₂ es divalente para la unión a antígeno. El enlace disulfuro de F(ab')₂ se puede escindir para obtener Fab'. Además, las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras se pueden fusionar conjuntamente para formar un único fragmento variable monocatenario (scFv).

Puesto que la primera generación de anticuerpos de tamaño completo presentó algunos problemas, muchos de los anticuerpos de la segunda generación comprenden solo fragmentos del anticuerpo. Los dominios variables (Fv) son los fragmentos más pequeños con un dominio de unión a antígeno intacto que consiste en un VL y un VH. Dichos fragmentos, con solo los dominios de unión, se pueden generar por enfoques enzimáticos o expresión de los fragmentos génicos pertinentes, por ejemplo en células bacterianas y eucariotas. Se pueden usar diferentes enfoques, por ejemplo el fragmento Fv solo o bien fragmentos 'Fab' que comprenden uno de los brazos superiores de la "Y" que incluye el Fv más los primeros dominios constantes. Estos fragmentos se estabilizan normalmente introduciendo una conexión polipeptídica entre las dos cadenas lo que da como resultado la producción de un Fv monocatenario (scFv). De forma alternativa, se pueden usar fragmentos Fv conectados por disulfuro (dsFv). Los dominios de unión de fragmentos se pueden combinar con cualquier dominio constante para producir anticuerpos de longitud completa o se pueden fusionar con otras proteínas y polipéptidos.

Un fragmento de anticuerpo recombinante es el fragmento Fv monocatenario (scFv), que es una parte funcionalmente activa preferente de un anticuerpo de acuerdo con la invención. En general, tiene una alta afinidad por su antígeno y se puede expresar en una variedad de huéspedes. Estas y otras propiedades hacen que los fragmentos scFv no sean solo aplicables en medicina, sino también con posibilidad para aplicaciones biotecnológicas. Como se detalla anteriormente, en el fragmento scFv los dominios VH y VL se unen con un conector peptídico flexible e hidrófilo, que mejora la eficacia del plegamiento y la expresión. Normalmente se usan conectores de aproximadamente 15 aminoácidos, de los que el conector (Gly4Ser)₃ se ha usado con más frecuencia. Las moléculas scFv se pueden degradar fácilmente de forma proteolítica, dependiendo del conector usado. Con el desarrollo de técnicas de ingeniería genética, estas limitaciones se pueden superar prácticamente por investigación centrada en la mejora de la función y estabilidad. Un ejemplo es la generación de fragmentos Fv estabilizados por disulfuro (o conectados por disulfuro) donde el dímero VH-VL se estabiliza por un enlace disulfuro intercatenario. Se introducen cisteínas en la interfase entre los dominios VL y VH, formando un puente disulfuro, que mantiene juntos los dos dominios.

La disociación de scFvs da como resultado scFv monoméricos, que se pueden complejar en dímeros (diacuerpos), trímeros (triacuerpos) o agregados más grandes tales como TandAbs y Flexibodies, que también representan partes funcionalmente activas de un anticuerpo de acuerdo con la invención.

Se pueden crear anticuerpos con dos dominios de unión a través de la unión de dos scFv con una única conexión polipeptídica (scFv)₂ o bien a través de la dimerización de dos monómeros (diacuerpos). Los diseños más simples son diacuerpos que tienen dos dominios de unión a antígeno funcionales que pueden ser iguales, similares (diacuerpos bivalentes) o bien tener especificidad por distintos antígenos (diacuerpos biespecíficos). Estos anticuerpos biespecíficos permiten, por ejemplo, el reclutamiento de funciones efectoras novedosas (tales como linfocitos T citotóxicos) para las células diana, lo que los hace muy útiles para aplicaciones en medicina.

Además, se han desarrollado formatos de anticuerpos que comprenden cuatro dominios variables de cadenas pesadas y cuatro dominios variables de cadenas ligeras. Los ejemplos de estos incluyen anticuerpos biespecíficos tetravalentes (TandAbs y Flexibodies, Affimed Therapeutics AG, Heidelberg, Alemania). Al contrario que un diacuerpo biespecífico, un TandAb biespecífico es un homodímero que consiste en un solo polipéptido. Debido a las dos cadenas diferentes, un diacuerpo puede construir tres dímeros diferentes de los que solo uno es funcional. Por lo tanto, es más simple y más económico producir y purificar este producto homogéneo. Además, el TandAb normalmente muestra mejores propiedades de unión (posee dos veces el número de sitios de unión) y un incremento en la estabilidad *in vivo*. Los Flexibodies son una combinación de scFv con un motivo de multímero de diacuerpo que da como resultado una molécula multivalente con un alto grado de flexibilidad para unir dos moléculas que están bastante distantes entre sí en la superficie celular. Si están presentes más de dos dominios de unión a antígeno funcionales y si tienen especificidad por distintos antígenos, el anticuerpo es multiespecífico.

En resumen, los tipos de inmunoglobulinas específicas que representan anticuerpos o partes funcionalmente activas de los mismos incluyen pero no se limitan al siguiente anticuerpo: un Fab (fragmento monovalente con los dominios de ligera variable (VL), pesada variable (VH), ligera constante (CL) y pesada constante 1 (CH1)), un F(ab')₂ (fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab conectados por un puente disulfuro o alternativo en la región bisagra), un Fv (dominios VL y VH), un scFv (un Fv monocatenario donde VL y VH se unen por un conector, por ejemplo, un conector peptídico), una molécula de anticuerpo biespecífico (una molécula de anticuerpo con especificidad como se describe en el presente documento conectada a un segundo resto funcional que tiene una especificidad de unión diferente del anticuerpo, incluyendo, sin limitación, otro péptido o proteína tal como un anticuerpo, o ligando de receptor), un dímero de Fv monocatenario biespecífico, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, un minicuerpo (un scFv unido a un CH3).

Determinadas moléculas de anticuerpo o partes funcionalmente activas de las mismas que incluyen, pero no se limitan a, Fv, scFv, moléculas de anticuerpo o anticuerpos de dominio (Domantis) se pueden estabilizar incorporando

puentes disulfuro para unir los dominios VH y VL. Se pueden producir anticuerpos biespecíficos usando tecnologías convencionales, de las que sus procedimientos específicos incluyen la producción químicamente, o de hibridomas híbridos) y otras tecnologías que incluyen, pero no se limitan a, la tecnología BiTETM (moléculas que poseen regiones de unión a antígeno de diferente especificidad con un conector peptídico) y genotecnología de "botones en ojales".

En consecuencia, una molécula de anticuerpo o parte funcionalmente activa de la misma puede ser un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fv, un Fv conectado por disulfuro, un scFv, un (scFv)₂, un anticuerpo bivalente, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo o un minicuerpo.

En otro modo de realización preferente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos monoespecíficos que son idénticos debido a que se producen por un tipo de célula inmunitaria que son todos clones de una única célula original. Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el que al menos una región de una inmunoglobulina de una especie se fusiona a otra región de una inmunoglobulina de otra especie por ingeniería genética para reducir su inmunogenicidad. Por ejemplo, se pueden fusionar regiones VF y VH murinas a la parte restante de una inmunoglobulina humana. Un tipo particular de anticuerpos quiméricos son los anticuerpos humanizados. Los anticuerpos humanizados se producen combinando el ADN que codifica las CDR de un anticuerpo no humano con ADN productor de anticuerpos humanos. A continuación se puede usar la construcción de ADN resultante para expresar y producir anticuerpos que normalmente no son tan inmunógenos como el anticuerpo original no humano o como el anticuerpo quimérico, simplemente puesto que las CDR son no humanas.

En un modo de realización preferente de la presente invención, una molécula de anticuerpo o parte funcionalmente activa de la misma usada en un procedimiento de la invención comprende un dominio constante de inmunoglobulina de la cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en: un dominio constante de IgM humana, un dominio constante de IgG1 humana, un dominio constante de IgG2 humana, un dominio constante de IgG3 humana, un dominio constante de IgG4 humana, un dominio constante de IgE humana y un dominio constante de IgA humana.

Como se detalla anteriormente en el contexto con el anticuerpo de la presente invención, cada cadena pesada de un anticuerpo natural tiene dos regiones, la región constante y la región variable. Existen cinco tipos de cadena pesada de inmunoglobulina de mamífero: γ , δ , α , μ y ϵ , que definen las clases de inmunoglobulinas IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente.

Existen aquí cuatro subclases de IgG (IgG1, 2, 3 y 4) en seres humanos, denominadas en orden según su abundancia en suero (siendo IgG1 la más abundante). Incluso aunque exista una similitud de aproximadamente un 95 % entre sus regiones Fc de las subclases de IgG, la estructura de las regiones bisagra son relativamente diferentes. Esta región, entre los brazos Fab (fragmento de unión a antígeno) y los dos dominios carboxiterminales CH2 y CH3 de ambas cadenas pesadas, determina la flexibilidad de la molécula. El segmento de bisagra superior (hacia el aminoterminal) permite la variabilidad del ángulo entre los brazos Fab (flexibilidad Fab-Fab) así como la flexibilidad rotacional de cada Fab individual. La flexibilidad de la región bisagra inferior (hacia el carboxiterminal) determina directamente la posición de los brazos Fab con relación a la región Fc (flexibilidad Fab-Fc). La flexibilidad Fab-Fab y Fab-Fc dependiente de bisagra puede ser importante en la activación de otras funciones efectoras tales como la activación del complemento y la unión al receptor de Fc. En consecuencia, la estructura de las regiones bisagra da a cada una de las cuatro clases de IgG su perfil biológico único.

La longitud y flexibilidad de la región bisagra varía entre las subclases de IgG. La región bisagra de IgG1 engloba los aminoácidos 216-231 y puesto que es libremente flexible, los fragmentos Fab pueden rotar sobre sus ejes de simetría y moverse dentro de una esfera centrada en el primero de dos puentes disulfuro entre cadenas pesadas. La IgG2 tiene una bisagra más corta que la IgG1, con 12 residuos aminoácidos y cuatro puentes disulfuro. La región bisagra de IgG2 carece de residuo glicina, es relativamente corta y contiene una doble hélice de poliprolina rígida, estabilizada por puentes disulfuro entre cadenas pesadas adicionales. Estas propiedades restringen la flexibilidad de la molécula de IgG2. La IgG3 difiere de las otras subclases por su única región bisagra extendida (aproximadamente cuatro veces tan larga como la bisagra de IgG1), que contiene 62 aminoácidos (incluyendo 21 prolina y 11 cisteínas), formando una doble hélice poliprolina inflexible. En la IgG3, los fragmentos Fab están relativamente lejos del fragmento Fc, dando a la molécula una mayor flexibilidad. La bisagra alargada en IgG3 también es responsable de su mayor peso molecular en comparación con las otras subclases. La región bisagra de IgG4 es más corta que la de IgG1 y su flexibilidad es intermedia entre la de IgG1 e IgG2.

En el caso en el que se use una proteína de unión a la vitamina D como segundo agente de unión, el pH durante esta etapa de incubación se selecciona en un modo de realización preferentemente entre pH 6,0 y pH 9,0.

En el caso en el que se use un anticuerpo que se une a 25-hidroxivitamina D en un modo de realización como segundo agente de unión, el pH durante esta etapa de incubación estará entre pH 5 y pH 8, preferentemente el pH durante esta etapa de incubación estará entre pH 5,5 y pH 7,5.

De acuerdo con un modo de realización específico, el primer agente de unión es un anticuerpo monoclonal o una

parte funcionalmente activa del anticuerpo monoclonal, y el segundo agente de unión es una proteína de unión a la vitamina D o una parte funcionalmente activa de la proteína de unión a la vitamina D.

En otro modo de realización, el primer agente de unión es un anticuerpo monoclonal o una parte funcionalmente activa del anticuerpo monoclonal y el segundo agente de unión es un anticuerpo monoclonal o una parte funcionalmente activa del anticuerpo monoclonal.

Además en otro modo de realización, el primer agente de unión es mAb<24,25-dihidroxivitamina D₃> o una parte funcionalmente activa del anticuerpo monoclonal y el segundo agente de unión es mAb<25-hidroxivitamina D> o una parte funcionalmente activa del anticuerpo monoclonal.

En un modo de realización de acuerdo con la presente invención, un agente de unión porta medios para la inmovilización y se puede usar para la inmovilización. Los medios para la inmovilización pueden permitir la unión a un soporte, preferentemente soporte sólido, de forma covalente o no covalente.

El término "soporte sólido" o "fase sólida" se refiere a un material en la fase sólida que interactúa con reactivos en la fase líquida por reacciones heterogéneas. El uso de soportes sólidos es bien conocido en los campos de la química, bioquímica, farmacia y biología molecular. Se han desarrollado muchos tipos de soportes sólidos dependiendo del problema técnico que se va a resolver. Cualquiera de estos se puede usar en el contexto de la presente invención. Por ejemplo, el soporte sólido usado en los procedimientos de la presente invención puede incluir componentes de sílice, acetato de celulosa, nitrocelulosa, nailon, poliéster, polietersulfona, poliolefina o poli(fluoruro de vinilideno), o combinaciones de los mismos. Otros soportes sólidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, vidrio de poro controlado, un portaobjetos o placa o de vidrio, poliestireno y dextrano activado. En otros aspectos, polímeros orgánicos sintéticos tales como poliacrilamida, polimetacrilato y poliestireno también son superficies de soporte ilustrativas. Además, polisacáridos tales como celulosa y dextrano, son otros ejemplos ilustrativos de superficies de soporte. Otras superficies de soporte tales como fibras también son factibles.

Los soportes de resina comunes usados, por ejemplo, en química de proteínas o combinatoria incluyen resina de poliestireno, por ejemplo reticulada con divinilbenceno; hidroximetilpoliestireno; aminometilpoliestireno; resina TentaGel (TG) y ArgoGel (AG): poliestireno/copolímeros de injerto DVB-poli(etilenglicol) (PS-PEG) - Bayer; Crowns/Pins (CP) (soporte de polietileno/polipropileno injertado con radiación); resinas a base de tierra de diatomeas/poliacrilamida (KPA); vidrio de poro controlado; copolímero de poli(etilenglicol)/dimetilacrilamida - PEGA.

La inmovilización a un soporte sólido se puede lograr usando soportes sólidos que se han modificado o activado para incluir grupos funcionales que permiten el acoplamiento covalente de la entidad o soporte al agente de unión, por ejemplo una proteína o un anticuerpo. Típicamente, se emplean brazos conectores alifáticos. El agente de unión, en particular proteínas o anticuerpos, también se pueden unir de forma no covalente a una superficie, a través de, por ejemplo, mecanismos iónicos o hidrófobos, y se separa por el liberador inhibiendo estos mecanismos localmente. Adicionalmente, la unión covalente de un agente de unión, por ejemplo una proteína o anticuerpo, a una superficie, por ejemplo una superficie de óxido metálico o vidrio, se puede lograr activando en primer lugar la superficie con un aminosilano. A continuación, se pueden unir agentes de unión derivatizados con grupos funcionales reactivos de amina a la superficie. Se pueden derivatizar soportes, en particular soportes sólidos con proteínas tales como enzimas, péptidos, oligonucleótidos y polinucleótidos por enlaces covalentes o no covalentes a través de uno o más sitios de unión, uniendo de este modo el mismo ácido al soporte sólido.

El soporte (sólido) puede estar contenido en un recipiente, en el que el recipiente es un tubo, tal como un tubo de centrífuga o tubo de centrifugación, jeringuillas, cartucho, cámara, placa de múltiples pocillos, o tubo de ensayo, o combinaciones de los mismos. El soporte (sólido) se puede pretratar o funcionalizar para permitir la unión mediada por conector del agente de unión. En un modo de realización, el soporte sólido puede ser fibroso o particulado permitiendo normalmente el contacto apropiado. El tamaño del soporte (sólido) adecuado para su uso en el procedimiento de la presente invención puede variar de acuerdo con el procedimiento elegido. El primer agente de unión o segundo agente de unión, respectivamente, se pueden unir a un soporte (sólido) solo (por ejemplo un recipiente o placa de múltiples pocillos) o se puede unir a una multitud de soportes (sólidos) (por ejemplo, perlas). La conformación del soporte (sólido) adecuado para su uso en los procedimientos de la presente invención puede ser, por ejemplo, una lámina, un disco precortado, cilindro, fibra individual, o un soporte sólido compuesto de materiales particulados. En un modo de realización, el soporte (sólido) puede ser fibroso o particulado para permitir el contacto óptimo. El tamaño del soporte (sólido) puede variar y se puede elegir dependiendo del procedimiento que se va a llevar a cabo.

En algunos modos de realización, el soporte sólido es una tira de prueba, un chip, en particular un chip de micromatriz o nanomatriz, una placa de microvaloración o una micropartícula (perla).

Muchos sistemas de prueba comerciales se basan en el uso del soporte sólido recubierto con avidina o estreptavidina (SA), por ejemplo placas de microvaloración recubiertas con SA, redes recubiertas con SA o micropartículas recubiertas con SA (perlas).

Un derivado de analito biotinilado se une, por ejemplo, a este soporte sólido de SA antes o durante el procedimiento de prueba. Cuando se detecta un compuesto de vitamina D, este compuesto derivado de analito biotinilado puede ser, por ejemplo, una 25-hidroxivitamina D₂ biotinilada y/o una 25-hidroxivitamina D₃ biotinilada.

En un modo de realización de la presente invención, el procedimiento *in vitro* de detección se lleva a cabo como ensayo competitivo. En una prueba competitiva de este tipo, un derivado del compuesto de vitamina D añadido en una cantidad definida a la prueba compite con el correspondiente compuesto de vitamina D de la muestra por los sitios de unión del agente de unión específica. Cuanto más compuesto de vitamina D esté presente en la muestra, menor es la señal de detección.

En un modo de realización, el derivado de un compuesto de vitamina D es un compuesto de vitamina D biotinilado. En otro modo de realización, el compuesto de vitamina D biotinilado es una 25-hidroxivitamina D₂ biotinilada y/o 25-hidroxivitamina D₃ biotinilada. En otro modo de realización, el compuesto de vitamina D biotinilado es una 25-hidroxivitamina D₂ biotinilada.

En un modo de realización, el derivado de un compuesto de vitamina D es un compuesto de vitamina D rutenilado. En otro modo de realización, el compuesto de vitamina D rutenilado es una 25-hidroxivitamina D₂ rutenilada y/o 25-hidroxivitamina D₃ rutenilada. En otro modo de realización, el compuesto de vitamina D rutenilado es una 25-hidroxivitamina D₂ rutenilada.

Como se menciona anteriormente, los segundos agentes de unión preferentes para su uso en un procedimiento de detección como se divulga en la presente descripción son anticuerpos y proteína de unión a la vitamina D. La proteína de unión a la vitamina D, si se usa en un formato de ensayo competitivo, dará lugar a una medición integrada de todos los compuestos de vitamina D que compiten con su unión a uno o más derivados del compuesto de vitamina D (biotinilado). En un modo de realización, la proteína de unión a la vitamina D será detectable marcada, por ejemplo, rutenilada.

En un modo de realización, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se realiza en un formato de ensayo competitivo, en el que

i) el soporte sólido es una micropartícula (perla) recubierta con SA, el competidor es un derivado de un compuesto de vitamina D biotinilado y el segundo agente de unión es un conjugado de proteína de unión a la vitamina D rutenilado, o

ii) el soporte sólido es una micropartícula (perla) recubierta con SA, el competidor es un conjugado de vitamina D rutenilado y el segundo agente de unión es un conjugado de proteína de unión a la vitamina D biotinilado.

De acuerdo con un modo de realización preferente, el primer agente de unión evita la unión de 24,25-dihidroxivitamina D₃ al segundo agente de unión. Todavía en otro modo de realización preferente, la 24,25-dihidroxivitamina D₃ unida al primer agente de unión no se puede unir por el segundo agente de unión. Además en otro modo de realización, el segundo agente de unión no puede liberar la 24,25-dihidroxivitamina D₃ unida al primer agente de unión.

Un experto en la técnica es consciente de que un compuesto de vitamina D presente en una muestra obtenida de un sujeto se une a la proteína de unión a la vitamina D. Por lo tanto, en los procedimientos de acuerdo con la presente invención, el compuesto de vitamina D presente en la muestra unido a la proteína de unión a la vitamina D se libera de la proteína de unión a la vitamina D antes de la etapa (b) con un reactivo de liberación en un modo de realización específico.

La muestra proporcionada obtenida de un sujeto de acuerdo con los procedimientos comprende un compuesto de vitamina D unido a la proteína de unión a la vitamina D en un modo de realización.

Un reactivo de liberación desnaturaliza la proteína de unión a la vitamina D, preferentemente el reactivo de liberación desnaturaliza de forma irreversible la proteína de unión a la vitamina D.

En un modo de realización específico, el compuesto de vitamina D se libera de la proteína de unión a la vitamina D antes de la etapa (b) por un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en una degradación proteolítica, una liberación ácida, una liberación alcalina, una liberación de metanol, una precipitación de etanol (documento WO 99/67211), una liberación de sal peryodato (documento EP 0 753 743), una extracción de acetonitrilo, una liberación de hidróxido de metal (documento US 7.087.395), una liberación por ciclodextrina y/o derivados de la misma (documento US 7.087.395) o una liberación de salicilato de metal (documento US 7.087.395), respectivamente. El experto en la técnica es consciente de los procedimientos adecuados para liberar un compuesto de vitamina D unido a la proteína de unión a la vitamina D antes de la determinación/medición del compuesto de vitamina D. En los últimos años, se propusieron una serie de reactivos de liberación diferentes que, en principio, deberían ser adecuados para liberar los compuestos de vitamina D de cualquier proteína de unión presente en la muestra.

En otro modo de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para determinar la concentración de 25-hidroxivitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D₃, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

5 a) proporcionar una muestra obtenida de un sujeto y

liberar el compuesto de vitamina D presente en la muestra unida a la proteína de unión a la vitamina D con un reactivo de liberación,

10 b) mezclar la muestra

(ba) con un primer agente de unión que se une a 24,25-dihidroxivitamina D₃, formando de este modo un complejo entre el primer agente de unión y 24,25-dihidroxivitamina D₃;

15 (bb) con un segundo agente de unión que se une a 25-hidroxivitamina D, formando de este modo un complejo entre el segundo agente de unión y 25-hidroxivitamina D;

c) medir el complejo formado en (bb), determinando de este modo la concentración de 25-hidroxivitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D₃.

20 De acuerdo con un modo de realización específico, el compuesto de vitamina D se libera de la proteína de unión a la vitamina D antes de la etapa (b) por una liberación alcalina. Las condiciones alcalinas dan como resultado la desnaturalización de la proteína de unión a la vitamina D y la liberación del compuesto de vitamina D presente en la muestra que se va a investigar. La concentración del agente alcalinizante debe ser suficiente para incrementar el pH de la "mezcla de reactivo" (= una muestra que se va a investigar + agente alcalinizante + reactivos adicionales) hasta al menos pH 10,0, preferentemente hasta al menos pH 10,5, más preferentemente hasta al menos 11,0 en la reacción de pretratamiento anterior a la etapa (b). El experto en la técnica es consciente de que el pH de la mezcla de reactivo se debe medir en el momento de la mezcla de la muestra que se va a investigar + agente alcalinizante + reactivos adicionales. Debido a la hidrólisis de la sal de hidrogenocarbonato y/o la sustancia que puede liberar iones hidrogenocarbonato (HCO₃⁻) tras la hidrólisis, el pH se reducirá en la mezcla de reactivo.

El reactivo de liberación comprende en un modo de realización específico una sal de hidrogenocarbonato y/o una sustancia que puede liberar iones de hidrogenocarbonato (HCO₃⁻) tras la hidrólisis en una concentración de 0,1 M a 2,0 M, un agente reductor y un agente alcalinizante. En otro modo de realización específico, el reactivo de liberación comprende una sal de hidrogenocarbonato en una concentración de 0,1 M a 2,0 M, un agente reductor y un agente alcalinizante. En otro modo de realización específico, el reactivo de liberación comprende una sustancia que puede liberar iones hidrogenocarbonato (HCO₃⁻) tras la hidrólisis en una concentración de 0,1 M a 2,0 M, un agente reductor y un agente alcalinizante. Dichos reactivos de liberación y procedimientos de liberación se describen en detalle en los documentos WO 2011/144661 y WO 2013/072342.

40 Un "ion hidrogenocarbonato" (ion bicarbonato) es un anión con la fórmula empírica HCO₃⁻ y una masa molecular de 61,01 dalton.

45 Una "sal de hidrogenocarbonato" es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en hidrogenocarbonato de sodio (NaHCO₃), hidrogenocarbonato de potasio (KHCO₃), hidrogenocarbonato de amonio (NH₄HCO₃), hidrogenocarbonato de calcio (Ca(HCO₃)₂) e hidrogenocarbonato de magnesio (Mg(HCO₃)₂).

50 Una "sustancia que puede liberar iones hidrogenocarbonato (HCO₃⁻) tras la hidrólisis" de acuerdo con un modo de realización de la presente invención es un éster de carbonato. Un "éster de carbonato" de acuerdo con la presente invención es un grupo carbonilo flanqueado por dos grupos alcoxi. La estructura general de estos carbonatos es R₁O(C=O)OR₂. Existen ésteres de carbonato cíclicos (por ejemplo, carbonato de etileno) o ésteres de carbonato no cíclicos (por ejemplo, carbonato de dimetilo) así como derivados hidroxilados o halogenados de los mismos disponibles.

55 Un experto en la técnica es consciente de seleccionar un agente reductor adecuado, por ejemplo seleccionado del grupo que consiste en 2-mercaptoetanol, 2-mercaptoetilamina-HCl, TCEP, cisteína-HCl y ditiotreitól (DTT).

Además, el experto en la técnica es consciente de seleccionar agentes alcalinizantes adecuados, por ejemplo seleccionados del grupo que consiste en NaOH, KOH, Ca(OH)₂ y LiOH, o una mezcla de los mismos.

60 Es ventajoso si esencialmente se realiza la liberación completa del analito (compuesto de vitamina D) de la molécula de unión (proteína de unión a la vitamina D) antes de la etapa (b) de los procedimientos de acuerdo con la presente invención.

65 En la etapa (b) de los procedimientos de acuerdo con la presente invención, el primer agente de unión y el segundo agente de unión se ponen en contacto simultáneamente con la muestra en un modo de realización específico. En

otras palabras, en un modo de realización específico, las etapas (ba) y (bb) se realizan simultáneamente de acuerdo con el/los procedimiento(s) de la presente invención.

En la etapa (b) de los procedimientos de acuerdo con la presente invención, el primer agente de unión se pone en contacto con la muestra antes o después de poner en contacto el segundo agente de unión con la muestra en un modo de realización específico. En otras palabras, en un modo de realización específico, la etapa (ba) se realiza antes de la etapa (bb) de acuerdo con el/los procedimiento(s) de la presente invención. En otro modo de realización, la etapa (ba) se realiza después de la etapa (bb) de acuerdo con el/los procedimiento(s) de la presente invención.

En un modo de realización de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, la concentración de 25-hidroxivitamina D se determina/mide/detecta en un procedimiento de inmunoensayo.

Los inmunoensayos son bien conocidos por el experto en la técnica. Los procedimientos para llevar a cabo dichos ensayos así como aplicaciones prácticas y procedimientos se resumen en libros de texto relacionados. Los ejemplos de libros de texto relacionados son Tijssen, P., *Preparation of enzyme-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates*, en: *Practice and theory of enzyme immunoassays*, pp. 221-278, Burdon, R.H. y v. Knippenberg, P.H. (eds.), Elsevier, Ámsterdam (1990), y diversos volúmenes de *Methods in Enzymology*, Colowick, S.P., y Caplan, N.O. (eds.), Academic Press), que tratan sobre procedimientos de detección inmunológicos, en especial los volúmenes 70, 73, 74, 84, 92 y 121.

En un modo de realización, el procedimiento para determinar la concentración de 25-hidroxivitamina D se selecciona del grupo que consiste en un inmunoensayo enzimático (ELISA), inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA), radioinmunoensayo (RIA) e inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA). En un modo de realización preferente, la 25-hidroxivitamina D se detecta en un inmunoensayo enzimático (ELISA). La 25-hidroxivitamina D se detecta en otro modo de realización preferente en un inmunoensayo de (electro-) quimioluminiscencia (ECLIA). La 25-hidroxivitamina D se detecta en otro modo de realización en un radioinmunoensayo (RIA). Además, un modo de realización preferente es un inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA) para la determinación de 25-hidroxivitamina D. Otros ensayos preferentes son inmunoensayo de fluorescencia de tipo sándwich (FIA), inmunoensayo enzimático de captura de micropartículas (MEIA), inmunoensayos de fluorescencia en fase sólida (SPFIA), inmunoensayo de fluorescencia de concentración de partículas (PCFIA), ensayo nefelométrico y turbidimétrico con y sin potenciación de partículas de látex (LPFA). Además, el ensayo puede ser en forma de tiras de prueba en un modo de realización.

En este momento, existen una serie de instrumentos comercialmente disponibles que utilizan la electroquimioluminiscencia (ECL) para mediciones analíticas. Para revisión, véase Richter, M.M., *Chem. Rev.* 104 (2004) 3003-3036. Se han usado especies que se pueden inducir para emitir ECL (especies activas ECL) como marcadores ECL. Los ejemplos de marcadores ECL incluyen compuestos organometálicos tales como el resto tris-bipiridil-rutenio $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ donde el metal es de, por ejemplo, los metales del grupo VII y VIII, incluyendo Re, Ru, Ir y Os. Las especies que reaccionan con el marcador ECL en el procedimiento ECL se denominan en el presente documento correactivos ECL. Los correactivos usados comúnmente para ECL incluyen aminas terciarias (por ejemplo tripropilamina (TPA)), oxalato y persulfato. La luz se genera por una reacción concertada de correactivos y marcadores ECL; la participación del reactivo de unión en una interacción de unión se puede controlar midiendo la ECL emitida desde el marcador ECL. De forma alternativa, la señal ECL de un compuesto ECL activo puede ser indicativa del entorno químico (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.641.623 y 5.643.713, que describe ensayos ECL que controlan la presencia o destrucción de correactivos ECL especiales). Para más antecedentes sobre ECL, marcadores ECL, ensayos ECL e instrumental para realizar ensayos ECL véanse los documentos EP 0 441 875, EP 0 500 305, EP 0 973 035, EP 1 892 524, y PCT publicadas n.º WO87/06706; WO89/10551; WO90/05301; WO93/01308; WO98/12539; WO99/32662; WO99/58962; WO98/57154 y WO2001/013095.

Los instrumentos ECL comercialmente disponibles han demostrado un rendimiento excepcional. Se han vuelto ampliamente usados por motivos que incluyen su excelente sensibilidad, intervalo dinámico, precisión, y tolerancia de matrices de muestra del complejo. El instrumental comercialmente disponible usa diseños basados en cubetas de lectura con cubetas de lectura reutilizables permanentes.

Los volúmenes de muestra disponibles para la determinación de analitos a menudo son limitados y cada vez se deben determinar más analitos diferentes a partir de una muestra. Además se requieren el desarrollo de equipo de laboratorio más rápido para la automatización de ensayos y procedimientos más sensibles para la detección de analitos. Esto da lugar a la necesidad de obtener ensayos electroquimioluminiscentes altamente sensibles y específicos y procedimientos para realizarlos. Además, se deben considerar mejoras asociadas con riesgos para la seguridad o problemas ambientales.

En otro modo de realización, se determina 25-hidroxivitamina D en un ensayo de tipo sándwich.

En otro modo de realización preferente, se usa un inmunoensayo de tipo sándwich para determinar 25-hidroxivitamina D en una muestra. Dicho inmunoensayo de tipo sándwich detecta específicamente 25-hidroxivitamina D en una muestra sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D₃.

En un ensayo de tipo sándwich, se usa el segundo agente de unión de acuerdo con la presente invención en un modo de realización para capturar 25-hidroxivitamina D y se usa un tercer agente de unión, que se marca para que sea directa o indirectamente detectable, para capturar el complejo formado del segundo agente de unión y 25-hidroxivitamina D.

El segundo agente de unión y el tercer agente de unión usados en un formato de ensayo de tipo sándwich son, en un modo de realización, anticuerpos, respectivamente, o en otro modo de realización, una combinación de una proteína de unión a la vitamina D como segundo agente de unión y un anticuerpo como tercer agente de unión. En el caso en el que se use un anticuerpo en un ensayo de tipo sándwich, se puede usar también una parte funcionalmente activa de un anticuerpo en un modo de realización.

En un modo de realización, se usan los kits de la presente invención para un inmunoensayo cualitativo (25-hidroxivitamina D presente o ausente) o cuantitativo (se determina la cantidad de 25-hidroxivitamina D) o semicuantitativo (se dan cantidades relativas, en particular por encima o por debajo de un valor de corte).

En un modo de realización preferente, se detecta 25-hidroxivitamina D en un inmunoensayo electroquímico o de electroquimioluminiscencia (=ECLIA). En un ensayo electroquímico o electroquimioluminiscente, se detecta una molécula de analito unida por un marcador conectado a un agente de detección (molécula diana). Un electrodo inicia electroquímicamente la luminiscencia de un marcador químico conectado a un agente de detección. La luz emitida por el marcador se mide por un fotodetector e indica la presencia o cantidad de complejos de molécula de analito/molécula diana unidas. Se describen procedimientos ECLA, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 5.543.112; 5.935.779; y 6.316.607. Se puede maximizar la modulación de señal por diferentes concentraciones de moléculas de analito para mediciones precisas y sensibles.

El término "marcador" o "marcador detectable" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier sustancia que puede producir una señal por medio de detección directa o indirecta. Por tanto, el marcador detectable se puede detectar directa o indirectamente. Para la detección directa, el marcador adecuado para su uso en la presente invención se puede seleccionar de cualquier grupo de marcadores detectables conocidos, como cromógenos, grupos fluorescentes, grupos quimioluminiscentes (por ejemplo ésteres de acridinio o dioxetanos), compuestos electroquimioluminiscentes, catalizadores, enzimas, sustratos enzimáticos, tintes, tintes fluorescentes (por ejemplo fluoresceína, cumarina, rodamina, oxacina, resorufina, cianina y derivados de las mismas), partículas coloidales metálicas y no metálicas, y partículas de látex polimérico orgánico. Otros ejemplos de marcadores detectables son complejos metálicos luminiscentes, tales como complejos de rutenio o europio, por ejemplo como se usa para ECLIA, enzimas, por ejemplo como se usa para ELISA, y radioisótopos; por ejemplo como se usa para RIA.

Los sistemas de detección indirecta comprenden, por ejemplo, que el reactivo de detección, por ejemplo el anticuerpo de detección, se marque con un primer compañero de un par de unión bioafín.

Los ejemplos de pares de unión adecuados son hapteno o antígeno/anticuerpo, biotina o análogos de biotina tales como aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina/avidina o estreptavidina, azúcar/lectina, ácido nucleico o análogo de ácido nucleico/ácido nucleico complementario, y receptor/ligando, por ejemplo receptor de hormona esteroidea/hormona esteroidea. Los primeros miembros del par de unión preferentes comprenden hapteno, antígeno y hormona. Son especialmente preferentes haptenos como digoxina y biotina y análogos de los mismos. El segundo compañero de dicho par de unión, por ejemplo un anticuerpo, estreptavidina, etc., se marca normalmente para permitir la detección directa, por ejemplo por los marcadores detectables como se menciona anteriormente.

El experto en la técnica es consciente de que el primer y/o segundo agente de unión se puede marcar con un marcador detectable, respectivamente. El experto en la técnica es consciente de que el marcador seleccionado para el primer agente de unión debe ser diferente del marcador seleccionado para el segundo agente de unión.

De acuerdo con un modo de realización específico, el primer agente de unión es mAb<24,25-dihidroxivitamina D₃> y el segundo agente de unión es una proteína de unión a la vitamina D, preferentemente una proteína de unión a la vitamina D marcada, más preferentemente una proteína de unión a la vitamina D biotinilada o rutenilada, respectivamente.

Para la detección directa, el grupo marcador o marcador adecuado para su uso en la presente invención se puede seleccionar de cualquier grupo de marcadores detectables conocidos, pero no se limitan a, cromógenos, grupos fluorescentes, quimioluminiscentes (por ejemplo ésteres de acridinio o dioxetanos), compuestos electroquimioluminiscentes, catalizadores, enzimas, sustratos enzimáticos, tintes, tintes fluorescentes (por ejemplo fluoresceína, cumarina, rodamina, oxacina, resorufina, cianina y derivados de las mismas), partículas coloidales metálicas y no metálicas, y partículas de látex polimérico orgánico. Otros ejemplos de grupos marcadores son complejos metálicos luminiscentes, tales como complejos de rutenio o europio, enzimas, por ejemplo, como se usan para ELISA y radioisótopos.

Los sistemas de detección indirecta comprenden, por ejemplo, que el reactivo de detección, por ejemplo el

anticuerpo de detección, se marque con un primer compañero de un par de unión bioafín. Los ejemplos de pares de unión adecuados son hapteno o antígeno/anticuerpo, biotina o análogos de biotina tales como aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina/avidina o estreptavidina, azúcar/lectina, ácido nucleico o análogo de ácido nucleico/ácido nucleico complementario, y receptor/ligando, por ejemplo receptor de hormona esteroidea/hormona esteroidea. Los primeros miembros del par de unión preferentes comprenden hapteno, antígeno y hormona. Son especialmente preferentes haptenos como digoxina y biotina y análogos de los mismos. El segundo compañero de dicho par de unión, por ejemplo un anticuerpo, estreptavidina, etc., se marca normalmente para permitir la detección directa, por ejemplo por los marcadores como se menciona anteriormente.

En un modo de realización específico, la concentración de 25-hidroxivitamina D en la muestra es de al menos 1 nmol/l (0,4 ng/ml), además preferente de como máximo 500 nmol/l (200 ng/ml), además preferente está en el intervalo de 10 nmol/l (4 ng/ml) a 500 nmol/l (200 ng/ml), además preferente en el intervalo de 10 nmol/l (4 ng/ml) a 250 nmol/l (100 ng/ml).

De acuerdo con la presente invención "reaccionar de forma cruzada" o "reactividad cruzada" quiere decir que la fuerza de unión a un compuesto de vitamina D que se va a determinar (por ejemplo 25-hidroxivitamina D) distinto del compuesto interferente (por ejemplo 24,25-dihidroxivitamina D₃) contra el que se dirige un primer agente de unión, en particular un anticuerpo, tiene un 10 % o menos, preferentemente un 5 % o menos de la fuerza de unión medida con el analito. La fuerza de unión se puede medir en particular aplicando una prueba de afinidad usando un BiaCore™. Como el experto en la técnica sabe, la afinidad de unión (fuerzas de unión o afinidad), si se da como K_d es la mayor/mejor, cuanto menor sea K_d.

Además, se puede demostrar en los ejemplos que el primer agente de unión de la invención no muestra ninguna reactividad cruzada significativa para 25-hidroxivitamina D; es decir, se ha descubierto que la reactividad cruzada para 25-hidroxivitamina D es de un 10 % o menos, en particular de 5 % o menos, en particular una reactividad cruzada de un 1 % o menos. En un modo de realización, el primer agente de unión no tiene reactividad cruzada significativa para 25-hidroxivitamina D, preferente el primer agente de unión tiene una reactividad cruzada de un 10 % o menos para 25-hidroxivitamina D, además preferente el primer agente de unión tiene una reactividad cruzada de un 5 % o menos para 25-hidroxivitamina D, además preferente el primer agente de unión tiene una reactividad cruzada de un 1 % o menos para 25-hidroxivitamina D, respectivamente. Por tanto, se pueden detectar además cantidades pequeñas de 25-hidroxivitamina D de forma específica y fiable, incluso en presencia de 24,25-dihidroxivitamina D₃.

De acuerdo con la presente invención, K_d(primer agente de unión) es la afinidad del primer agente de unión por 24,25-dihidroxivitamina D₃, y K_d(segundo agente de unión) es la afinidad del segundo agente de unión por 25-hidroxivitamina D.

"Afinidad" define la fuerza de interacción entre las dos especies, y se determina preferentemente por medio de resonancia de plasmón superficial, en particular usando el sistema BiaCore®. En el caso de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, la afinidad se determina como el valor de K_d determinado preferentemente por medio de resonancia de plasmón superficial, en particular usando el sistema BiaCore®. La determinación de la afinidad se puede realizar como se describe en "Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics", Current Opinion in Immunology, volumen 5, publicación 2, 1993, páginas 282-286.

Además, de acuerdo con la invención, Conc(primer agente de unión) y Conc(segundo agente de unión) son las concentraciones molares del primer agente de unión y el segundo agente de unión, respectivamente, en la etapa b) del procedimiento de la invención anterior.

Además, de acuerdo con la invención, MR(primer agente de unión) es la valencia de unión del primer agente de unión para la unión a 24,25-dihidroxivitamina D₃ y MR(segundo agente de unión) es la valencia de unión del segundo agente de unión para 25-hidroxivitamina D.

"Valencia de unión" de acuerdo con la presente invención se entiende como el número experimentalmente determinado de sitios de unión para un par dado de compañeros de unión. En el caso de anticuerpos o partes funcionalmente activas de los mismos, la valencia de unión teórica es típicamente de 1 o 2, pero las valencias de unión determinadas experimentalmente pueden ser valores no enteros (por ejemplo 1,4) debido a efectos estéricos. En el caso de anticuerpos como primer agente de unión preferente, la valencia de unión teórica es típicamente de 1. De nuevo, la valencia de unión determinada experimentalmente puede ser un valor no entero (por ejemplo 0,9) debido a efectos estéricos. La determinación de la valencia de unión se puede realizar como se describe en Schraeml M. *et al.* (2012) Methods in Molecular Biology Vol. 901, 171-181.

Para lograr una medición esencialmente completa de 25-hidroxivitamina D, es ventajoso si la K_d del primer agente de unión para 24,25-dihidroxivitamina D₃ es como máximo 10 veces mayor, preferentemente el mismo, más preferentemente menor que la afinidad del segundo agente de unión por 25-hidroxivitamina D. Por lo tanto, en otro modo de realización preferente, K_d(primer agente de unión) / K_d(segundo agente de unión) es de 10 o menos, preferentemente 1 o menos, más preferentemente 0,1 o menos.

Para lograr una medición esencialmente completa de 25-hidroxivitamina D, es ventajoso además en un modo de realización si la concentración del primer agente de unión es la misma, preferentemente al menos 10 veces mayor, además preferente 50 veces mayor, además preferente 100 veces mayor, también preferente 200 veces mayor, respectivamente, que la concentración del segundo agente de unión. Por lo tanto, todavía en otro modo de realización preferente, $\text{Conc}(\text{primer agente de unión}) / \text{Conc}(\text{segundo agente de unión})$ es como máximo 200, preferentemente como máximo 100, preferentemente como máximo 50, preferentemente como máximo 10, preferentemente como máximo 1, respectivamente, en particular en el que $\text{Conc}(\text{primer agente de unión})$ está en el intervalo de desde $1 \cdot (1 \text{ a } 10) \text{ nmol/l}$ a $200 \cdot (1 \text{ a } 10) \text{ nmol/l}$, y/o $\text{Conc}(\text{segundo agente de unión})$ está en el intervalo de desde 1 a 10 nmol/l.

De acuerdo con un modo de realización específico, el primer agente de unión tiene, preferente, al menos el mismo, preferentemente al menos 10 veces mayor, además preferente al menos 100 veces mayor afinidad de unión por 24,25-dihidroxivitamina D_3 , respectivamente, que el segundo agente de unión.

Otro aspecto importante son las valencias de unión del primer agente de unión y el segundo agente de unión empleados en el procedimiento de la invención, en particular en el caso en el que el primer agente de unión y/o el segundo agente de unión sean anticuerpos o partes funcionalmente activas de los mismos. Cuando se une a analitos pequeños, por ejemplo, un compuesto de vitamina D, una molécula de unión que es un anticuerpo típicamente muestra una valencia de unión de $MR=2$, mientras que por motivos estéricos, siendo el primer agente de unión un anticuerpo típicamente muestra una valencia de unión de $MR=1$ y más pequeño. En este caso, el cociente de molaridad funcional se debe considerar preferentemente.

Además es ventajoso para determinar la cantidad total de analito (por ejemplo, un compuesto de vitamina D, preferentemente 25-hidroxivitamina D) si el segundo agente de unión, que está destinado a unirse al analito, presenta una afinidad suficientemente alta por este analito. Además es ventajoso si el primer agente de unión, que está destinado a unirse a 24,25-dihidroxivitamina D_3 , presenta una afinidad suficientemente alta por esta 24,25-dihidroxivitamina D_3 .

Además es ventajoso para determinar la cantidad total de 25-hidroxivitamina D si la afinidad del primer agente de unión para la unión a 24,25-dihidroxivitamina D_3 es suficientemente alta para lograr la unión esencialmente completa de 24,25-dihidroxivitamina D_3 al primer agente de unión. Por lo tanto, en otro modo de realización, la K_d del primer agente de unión para la unión a 24,25-dihidroxivitamina D_3 es de 10^{-8} mol/l o menos, preferentemente de 10^{-9} mol/l o menos, más preferentemente de 10^{-10} mol/l o menos.

Todavía en otro modo de realización, la K_d del segundo agente de unión para la unión a 25-hidroxivitamina D es de 10^{-8} mol/l o menos, preferentemente de 10^{-9} mol/l o menos, más preferentemente de 10^{-10} mol/l o menos.

Además es ventajoso si el primer agente de unión presenta especificidad por la 24,25-dihidroxivitamina D_3 para minimizar la detección de falsos positivos de 25-hidroxivitamina D. Además, es ventajoso si el primer agente de unión presenta especificidad por 24,25-dihidroxivitamina D_3 , en particular para minimizar la pérdida del primer agente de unión y para maximizar la unión a 24,25-dihidroxivitamina D_3 . Por lo tanto, en un modo de realización preferente, el primer agente de unión se une a 24,25-dihidroxivitamina D_3 específicamente, en particular la unión del primer agente de unión a una diana diferente de 24,25-dihidroxivitamina D_3 es como máximo de un 5 % de la unión del primer agente de unión a 24,25-dihidroxivitamina D_3 .

Todavía en otro modo de realización específico, la concentración del primer agente de unión está en el intervalo de $1 \cdot (1 \text{ a } 10) \text{ nmol/l}$ a $200 \cdot (1 \text{ a } 10) \text{ nmol/l}$, tal como $1 \cdot (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 \text{ o } 10) \text{ nmol/l}$ a $200 \cdot (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 \text{ o } 10) \text{ nmol/l}$, en particular de 1 a 1000 nmol/l, de 30 a 800 nmol/l, de 50 a 700 nmol/l, de 100 a 600 nmol/l.

Un experto en la técnica es consciente de que dichos procedimientos necesitan estandarizarse para una medición cuantitativa de un compuesto de vitamina D. Todavía en otro modo de realización, los procedimientos de acuerdo con la presente invención se estandarizan por un calibrador de vitamina D.

Un experto en la técnica también es consciente de que los procedimientos para determinar la concentración de 25-hidroxivitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D_3 de acuerdo con la presente invención también se pueden ejecutar con un procedimiento modificado.

En otro modo de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para determinar la concentración de 25-hidroxivitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D_3 , comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) proporcionar una muestra obtenida de un sujeto,

b) mezclar la muestra con un primer agente de unión que se une a 24,25-dihidroxivitamina D_3 y un segundo agente de unión que se une a 25-hidroxivitamina D, formando de este modo un primer complejo entre el primer agente

de unión y 24,25-dihidroxitamina D₃ y un segundo complejo entre el segundo agente de unión y 25-hidroxitamina D, respectivamente, y

- c) medir el segundo complejo formado en (b), determinando de este modo la concentración de 25-hidroxitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxitamina D₃.

En otro modo de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para determinar la concentración de 25-hidroxitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxitamina D₃, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- a) proporcionar una muestra obtenida de un sujeto,

- b) mezclar la muestra

(ba) con un primer agente de unión que se une a 24,25-dihidroxitamina D₃, formando de este modo un primer complejo entre el primer agente de unión y 24,25-dihidroxitamina D₃,

(bb) con un segundo agente de unión que se une a 25-hidroxitamina D, formando de este modo un segundo complejo entre el agente de unión y 25-hidroxitamina D,

- c) separar el segundo complejo que comprende el segundo agente de unión y 25-hidroxitamina D del segundo agente de unión que no comprende 25-hidroxitamina D, y

- d) medir el segundo complejo formado en (bb), midiendo de este modo la 25-hidroxitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxitamina D₃.

En otro modo de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para determinar la concentración de 25-hidroxitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxitamina D₃, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- a) proporcionar una muestra obtenida de un sujeto,

- b) mezclar la muestra

(ba) con un primer agente de unión que se une a 24,25-dihidroxitamina D₃, formando de este modo un complejo entre el primer agente de unión y 24,25-dihidroxitamina D₃,

(bb) con un segundo agente de unión que se une a 25-hidroxitamina D,

- c) mezclar la muestra con una 25-hidroxitamina D marcada, compitiendo la 25-hidroxitamina D de la muestra y la 25-hidroxitamina D marcada por la unión al segundo agente de unión que se une a 25-hidroxitamina D, obteniendo de este modo un segundo complejo entre el segundo agente de unión y la 25-hidroxitamina D marcada,

- d) separar la 25-hidroxitamina D marcada comprendida en el segundo complejo obtenido en la etapa (c) de la 25-hidroxitamina D marcada no comprendida en el segundo complejo, y

- e) medir la 25-hidroxitamina D marcada comprendida en el segundo complejo, midiendo de este modo la 25-hidroxitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxitamina D₃.

En otro modo de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para determinar la concentración de 25-hidroxitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxitamina D₃, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- a) proporcionar una muestra obtenida de un sujeto y

liberar el compuesto de vitamina D presente en la muestra unida a la proteína de unión a la vitamina D con un reactivo de liberación,

- b) mezclar la muestra

(ba) con un primer agente de unión que se une a 24,25-dihidroxitamina D₃, formando de este modo un complejo entre el primer agente de unión y 24,25-dihidroxitamina D₃,

(bb) con un segundo agente de unión que se une a 25-hidroxitamina D,

c) mezclar la muestra con una 25-hidroxivitamina D marcada, compitiendo la 25-hidroxivitamina D de la muestra y la 25-hidroxivitamina D marcada por la unión al segundo agente de unión que se une a 25-hidroxivitamina D, obteniendo de este modo un segundo complejo entre el segundo agente de unión y la 25-hidroxivitamina D marcada,

d) separar la 25-hidroxivitamina D marcada comprendida en el segundo complejo obtenido en la etapa (c) de la 25-hidroxivitamina D marcada no comprendida en el segundo complejo, y

e) medir la 25-hidroxivitamina D marcada comprendida en el segundo complejo, midiendo de este modo la 25-hidroxivitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D₃.

Uso:

Usando los procedimientos de la invención, se puede detectar la cantidad total y/o concentración de 25-hidroxivitamina D.

En un modo de realización, la presente invención se refiere al uso de un procedimiento *in vitro* de acuerdo con el/los procedimiento(s) de la presente invención para determinar la concentración de 25-hidroxivitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D₃.

En otro modo de realización, la presente invención se refiere al uso de un primer agente de unión que se une a 24,25-dihidroxivitamina D₃ y un segundo agente de unión que se une a 25-hidroxivitamina D en procedimiento(s) *in vitro* de acuerdo con la presente invención para determinar la concentración de 25-hidroxivitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D₃ en una muestra obtenida de un sujeto.

Se usa preferentemente como primer agente de unión mAb<24,25-dihidroxivitamina D₃> y como segundo agente de unión una proteína de unión a la vitamina D de acuerdo con un modo de realización de la presente invención.

Además, la presente invención se refiere en un modo de realización al uso de un kit divulgado en el presente documento para la determinación de 25-hidroxivitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D₃.

Kit:

En un modo de realización, la presente invención se refiere a un kit para para realizar el/los procedimiento(s) de acuerdo con la presente invención que comprende al menos

a) un primer agente de unión que se une a 24,25-dihidroxivitamina D₃, en el que el primer agente de unión es un anticuerpo monoclonal o una parte funcionalmente activa del anticuerpo monoclonal, y

b) un segundo agente de unión que se une a 25-hidroxivitamina D, en el que el segundo agente de unión es una proteína de unión a la vitamina D.

Se proporciona preferentemente como primer agente de unión mAb<24,25-dihidroxivitamina D₃> y como segundo agente de unión una proteína de unión a la vitamina D en un kit de acuerdo con un modo de realización de la presente invención.

El experto en la técnica es consciente de que los reactivos divulgados en el presente documento son adecuados para la fabricación de un kit para practicar los procedimientos de acuerdo con la presente invención.

En un modo de realización específico, el kit también comprende una composición de reactivo que tiene de 0,1 M a 2,0 M de una sal de hidrogenocarbonato o de una sustancia que puede liberar iones hidrogenocarbonato (HCO₃⁻) tras la hidrólisis, un agente reductor, y un agente alcalinizante, preferentemente el kit comprende una composición de reactivo que tiene de 0,1 M a 2,0 M de una sal de hidrogenocarbonato o de una sustancia que puede liberar iones hidrogenocarbonato (HCO₃⁻) tras la hidrólisis, de 2 mM a 30 mM de un agente reductor, una solución de 1 M a 1,5 M de un agente alcalinizante, además de un primer agente de unión y un segundo agente de unión de acuerdo con la presente invención.

En otro modo de realización específico, el kit comprende un agente reductor seleccionado del grupo que consiste en 2-mercaptoetanol, 2-mercaptoetilamina-HCl, TCEP, cisteína-HCl y ditiotreitól (DTT) y una solución de 1 M a 1,5 M de un agente alcalinizante seleccionado del grupo que consiste en NaOH, KOH, Ca(OH)₂.

Además, el kit comprende en un modo de realización un calibrador de vitamina D.

El kit de acuerdo con la invención ha demostrado ser adecuado para su uso en una prueba automatizada para compuestos de vitamina D. La presente invención preferentemente se refiere al uso de un kit de acuerdo con la invención para la determinación de 25-hidroxivitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D₃.

Preferentemente, la prueba para 25-hidroxivitamina D es completamente automatizada. Completamente automatizada en este caso quiere decir que el experimentador solo tiene que disponer una muestra que se va a investigar y un envase de reactivos que contiene todos los componentes para medir un compuesto de vitamina D en un analizador automatizado y todas las demás etapas se llevan a cabo automáticamente por el analizador. La prueba completamente automatizada se lleva a cabo de forma particularmente preferente en un analizador Elecsys® de Roche Diagnostics.

La composición de reactivo, primer agente de unión y segundo agente de unión, respectivamente, de acuerdo con la invención en otro modo de realización se usan en un procedimiento *in vitro* para la detección de 25-hidroxivitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D₃, en el que la 25-hidroxivitamina D se selecciona del grupo que comprende 25-hidroxivitamina D₂, 25-hidroxivitamina D₃ y 3-epi-25-hidroxivitamina D, preferentemente 25-hidroxivitamina D₂, 25-hidroxivitamina D₃.

Como ya se ha mencionado anteriormente, 25-hidroxivitamina D₂ y 25-hidroxivitamina D₃ son formas en particular relevantes de la vitamina D para el diagnóstico. En el/los procedimiento(s) *in vitro* de acuerdo con la invención, la detección específica de 25-hidroxivitamina D₂ o 25-hidroxivitamina D₃ o ambas por medio de un anticuerpo específico para 25-hidroxivitamina D₂ o 25-hidroxivitamina D₃ sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D₃ también representa un modo de realización preferente.

A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2.^a ed., J. Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994); March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure, 4.^a ed., John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1992); Lewin, B., Genes V, publicado por Oxford University Press (1994), ISBN 0-19-854287-9; Kendrew, J. *et al.* (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Science Ltd. (1994), ISBN 0-632-02182-9; y Meyers, R.A. (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc. (1995), ISBN 1-56081-569-8 proporcionan a un experto en la técnica una guía general para muchos de los términos usados en la presente solicitud.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican con detalle en la literatura, tal como, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (1989); Gait, M.J., Oligonucleotide Synthesis (1984); Freshney, R.I. (ed.), Animal Cell Culture (1987); Methods in Enzymology, Academic Press, Inc.; Ausubel, F.M. *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, (1987) y actualizaciones periódicas; Mullis *et al.* (eds.), PCR: The Polymerase Chain Reaction (1994).

Otros rasgos y modos de realización opcionales de la invención se divulgarán con más detalle en la posterior descripción de los modos de realización preferentes, preferentemente conjuntamente con las reivindicaciones dependientes. En las mismas, los rasgos opcionales respectivos se pueden lograr de forma aislada así como en cualquier combinación factible arbitraria, como se dará cuenta el experto. El alcance de la invención no está restringido por los modos de realización preferentes.

Resumiendo los hallazgos de la presente invención, los siguientes modos de realización son preferentes:

1. Un procedimiento *in vitro* para determinar la concentración de 25-hidroxivitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D₃, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - a) proporcionar una muestra obtenida de un sujeto que comprende un compuesto de vitamina D unido a la proteína de unión a la vitamina D,
 - b) mezclar la muestra
 - (ba) con un primer agente de unión que se une a 24,25-dihidroxivitamina D₃, formando de este modo un complejo entre el primer agente de unión y 24,25-dihidroxivitamina D₃;
 - (bb) con un segundo agente de unión que se une a 25-hidroxivitamina D, formando de este modo un complejo entre el segundo agente de unión y 25-hidroxivitamina D;
 - c) medir el complejo formado en (bb), determinando de este modo la concentración de 25-hidroxivitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D₃.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra es sangre, suero o plasma.
3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que el compuesto de

vitamina D presente en la muestra unido a la proteína de unión a la vitamina D se libera de la proteína de unión a la vitamina D antes de la etapa (b) con un reactivo de liberación.

4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el reactivo de liberación desnatura la proteína de unión a la vitamina D, preferentemente el reactivo de liberación irreversible desnatura la proteína de unión a la vitamina D.
5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, en el que el compuesto de vitamina D se libera de la proteína de unión a la vitamina D antes de la etapa (b) por un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en una degradación proteolítica, una liberación ácida, una liberación alcalina, una liberación de metanol, una precipitación de etanol, una liberación de sal de peryodato, una extracción de acetonitrilo, una liberación de hidróxido de metal, una liberación por ciclodextrina y/o derivados de la misma o una liberación de salicilato de metal, respectivamente.
6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, en el que el reactivo de liberación comprende una sal de hidrogenocarbonato en una concentración de 0,1 M a 2,0 M y/o una sustancia que puede liberar iones hidrogenocarbonato (HCO_3^-) tras la hidrólisis en una concentración de 0,1 M a 2,0 M, un agente reductor y un agente alcalinizante.
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que
 - $K_d(\text{primer agente de unión}) / K_d(\text{segundo agente de unión})$ es de 10 o menos, preferentemente de 1 o menos, más preferentemente de 0,1 o menos; y/o
 - $\text{Conc}(\text{primer agente de unión}) / \text{Conc}(\text{segundo agente de unión})$ es como máximo de 200, preferentemente como máximo de 100, preferentemente como máximo de 50, más preferentemente como máximo de 10,en el que $K_d(\text{primer agente de unión})$ es la afinidad del primer agente de unión por 24,25-dihidroxitamina D_3 y $K_d(\text{segundo agente de unión})$ es la afinidad del segundo agente de unión por 25-hidroxitamina D, y en el que $\text{Conc}(\text{primer agente de unión})$ y $\text{Conc}(\text{segundo agente de unión})$ son las concentraciones molares del primer agente de unión y el segundo agente de unión, respectivamente, en la etapa b), en particular en el que $\text{Conc}(\text{primer agente de unión})$ está en el intervalo de $1 \cdot (1 \text{ a } 10) \text{ nmol/l}$ a $200 \cdot (1 \text{ a } 10) \text{ nmol/l}$, y/o $\text{Conc}(\text{segundo agente de unión})$ está en el intervalo de desde 1 a 10 nmol/l.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que
 - la K_d del primer agente de unión para la unión a 24,25-dihidroxitamina D_3 es de 10^{-8} mol/l o menos, preferentemente de 10^{-9} mol/l o menos, más preferentemente de 10^{-10} mol/l o menos; y/o
 - la K_d del segundo agente de unión para la unión a 25-hidroxitamina D es de 10^{-8} mol/l o menos, preferentemente de 10^{-9} mol/l o menos, más preferentemente de 10^{-10} mol/l o menos.
9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8,
 - a) en el que el sujeto es un ser humano; y/o
 - b) en el que el procedimiento se selecciona del grupo que consiste en un inmunoensayo enzimático (ELISA), inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA), radioinmunoensayo (RIA) e inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA); y/o
 - c) en el que la 25-hidroxitamina D se selecciona del grupo que consiste en 25-hidroxitamina D_2 , 25-hidroxitamina D_3 y 3-epi-25-hidroxitamina D; y/o
 - d) en el que la 25-hidroxitamina D se selecciona del grupo que consiste en 25-hidroxitamina D_2 y 25-hidroxitamina D_3 ; y/o
 - e) en el que el primer agente de unión se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal y anticuerpo sintético (anticuerpo plástico), preferente un anticuerpo sintético o anticuerpo monoclonal, además preferente un anticuerpo monoclonal o una parte funcionalmente activa del anticuerpo monoclonal, respectivamente; y/o
 - f) en el que el segundo agente de unión es una proteína de unión a la vitamina D, preferente una proteína de unión a la vitamina D recombinante; y/o

- g) en el que el primer agente de unión es un anticuerpo monoclonal o una parte funcionalmente activa del anticuerpo monoclonal, y el segundo agente de unión es una proteína de unión a la vitamina D o una parte funcionalmente activa de la proteína de unión a la vitamina D; y/o
- 5 h) en el que el primer agente de unión es mAb<24,25-dihidroxitamina D₃> y el segundo agente de unión es una proteína de unión a la vitamina D, preferentemente una proteína de unión a la vitamina D marcada, más preferentemente una proteína de unión a la vitamina D rutenilada; y/o
- 10 i) en el que el primer agente de unión es un anticuerpo monoclonal o una parte funcionalmente activa del anticuerpo monoclonal y el segundo agente de unión es un anticuerpo monoclonal o una parte funcionalmente activa del anticuerpo monoclonal; y/o
- 15 j) en el que el primer agente de unión es mAb<24,25-dihidroxitamina D₃> o una parte funcionalmente activa del anticuerpo monoclonal, y el segundo agente de unión es mAb<25-hidroxitamina D> o una parte funcionalmente activa del anticuerpo monoclonal, que se puede inmovilizar en un soporte sólido; y/o
- 20 k) en el que el primer agente de unión evita la unión de 24,25-dihidroxitamina D₃ al segundo agente de unión; y/o
- l) en el que la 24,25-dihidroxitamina D₃ unida al primer agente de unión no se puede unir por el segundo agente de unión; y/o
- 25 m) en el que el segundo agente de unión no puede liberar la 24,25-dihidroxitamina D₃ unida al primer agente de unión; y/o
- n) en el que el primer agente de unión tiene al menos el mismo, preferentemente al menos 10 veces mayor, además preferente al menos 100 veces mayor afinidad de unión por 24,25-dihidroxitamina D₃, respectivamente, que el segundo agente de unión; y/o
- 30 o) en el que el primer agente de unión no tiene reactividad cruzada significativa para 25-hidroxitamina D, preferente el primer agente de unión tiene una reactividad cruzada de un 10 % o menos para 25-hidroxitamina D, además preferente el primer agente de unión tiene una reactividad cruzada de un 5 % o menos para 25-hidroxitamina D, además preferente el primer agente de unión tiene una reactividad cruzada de un 1 % o menos para 25-hidroxitamina D, respectivamente; y/o
- 35 p) en el que el primer agente de unión y el segundo agente de unión de acuerdo con la etapa (b) de la reivindicación 1 se ponen en contacto simultáneamente con la muestra; y/o
- 40 q) en el que el primer agente de unión se pone en contacto con la muestra de acuerdo con la etapa b) de la reivindicación 1 antes o después de poner en contacto con el segundo agente de unión con la muestra; y/o
- 45 r) en el que la concentración de 25-hidroxitamina D en la muestra es de al menos 1 nmol/l (0,4 ng/ml), además preferente de como máximo 500 nmol/l (200 ng/ml), además preferente está en el intervalo de 10 nmol/l (4 ng/ml) a 500 nmol/l (200 ng/ml), además preferente en el intervalo de 10 nmol/l (4 ng/ml) a 250 nmol/l (100 ng/ml); y/o
- s) en el que el procedimiento se estandariza por un calibrador de vitamina D.
- 50 10. Uso de un procedimiento *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para determinar la concentración de 25-hidroxitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxitamina D₃.
11. Uso de un primer agente de unión que se une a 24,25-dihidroxitamina D₃ y un segundo agente de unión que se une a 25-hidroxitamina D en un procedimiento *in vitro* para determinar la concentración de 25-hidroxitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxitamina D₃ en una muestra obtenida de un sujeto.
- 55 12. Un kit para realizar el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que comprende al menos
- 60 a) un primer agente de unión que se une a 24,25-dihidroxitamina D₃, en el que el primer agente de unión es un anticuerpo monoclonal o una parte funcionalmente activa del anticuerpo monoclonal, y
- b) un segundo agente de unión que se une a 25-hidroxitamina D, en el que el segundo agente de unión es una proteína de unión a la vitamina D.
- 65 13. Un procedimiento *in vitro* para determinar la concentración de 25-hidroxitamina D sin interferencia por

24,25-dihidroxitamina D₃, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) proporcionar una muestra obtenida de un sujeto,

b) mezclar la muestra con un primer agente de unión que se une a 24,25-dihidroxitamina D₃ y un segundo agente de unión que se une a 25-hidroxitamina D, formando de este modo un primer complejo entre el primer agente de unión y 24,25-dihidroxitamina D₃ y un segundo complejo entre el segundo agente de unión y 25-hidroxitamina D, respectivamente, y

c) medir el segundo complejo formado en (b), determinando de este modo la concentración de 25-hidroxitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxitamina D₃.

14. Un procedimiento *in vitro* para determinar la concentración de 25-hidroxitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxitamina D₃, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) proporcionar una muestra obtenida de un sujeto,

b) mezclar la muestra

ba) con un primer agente de unión que se une a 24,25-dihidroxitamina D₃, formando de este modo un primer complejo entre el primer agente de unión y 24,25-dihidroxitamina D₃,

bb) con un segundo agente de unión que se une a 25-hidroxitamina D, formando de este modo un segundo complejo entre el agente de unión y 25-hidroxitamina D,

c) separar el segundo complejo que comprende el segundo agente de unión y 25-hidroxitamina D del segundo agente de unión que no comprende 25-hidroxitamina D, y

d) medir el segundo complejo formado en (bb), midiendo de este modo la 25-hidroxitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxitamina D₃.

15. Un procedimiento *in vitro* para determinar la concentración de 25-hidroxitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxitamina D₃, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) proporcionar una muestra obtenida de un sujeto,

b) mezclar la muestra

(ba) con un primer agente de unión que se une a 24,25-dihidroxitamina D₃, formando de este modo un complejo entre el primer agente de unión y 24,25-dihidroxitamina D₃,

(bb) con un segundo agente de unión que se une a 25-hidroxitamina D,

c) mezclar la muestra con una 25-hidroxitamina D marcada, compitiendo la 25-hidroxitamina D de la muestra y la 25-hidroxitamina D marcada por la unión al segundo agente de unión que se une a 25-hidroxitamina D, obteniendo de este modo un segundo complejo entre el segundo agente de unión y la 25-hidroxitamina D marcada,

d) separar la 25-hidroxitamina D marcada comprendida en el segundo complejo obtenido en la etapa (c) de la 25-hidroxitamina D marcada no comprendida en el segundo complejo, y

e) medir la 25-hidroxitamina D marcada comprendida en el segundo complejo, midiendo de este modo la 25-hidroxitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxitamina D₃.

16. Un procedimiento *in vitro* para determinar la concentración de 25-hidroxitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxitamina D₃, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) proporcionar una muestra obtenida de un sujeto y liberar el compuesto de vitamina D presente en la muestra unida a la proteína de unión a la vitamina D con un reactivo de liberación,

b) mezclar la muestra

(ba) con un primer agente de unión que se une a 24,25-dihidroxitamina D₃, formando de este modo un complejo entre el primer agente de unión y 24,25-dihidroxitamina D₃,

(bb) con un segundo agente de unión que se une a 25-hidroxitamina D,

- c) mezclar la muestra con una 25-hidroxivitamina D marcada, compitiendo la 25-hidroxivitamina D de la muestra y la 25-hidroxivitamina D marcada por la unión al segundo agente de unión que se une a 25-hidroxivitamina D, obteniendo de este modo un segundo complejo entre el segundo agente de unión y la 25-hidroxivitamina D marcada,
- d) separar la 25-hidroxivitamina D marcada comprendida en el segundo complejo obtenido en la etapa (c) de la 25-hidroxivitamina D marcada no comprendida en el segundo complejo, y
- e) medir la 25-hidroxivitamina D marcada comprendida en el segundo complejo, midiendo de este modo la 25-hidroxivitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D₃.

Descripción de las figuras:

La invención se aclara adicionalmente por los siguientes ejemplos y figuras. El alcance protector real resulta de las reivindicaciones adjuntas a la presente invención. Los modos de realización se representan esquemáticamente en las figuras.

Figura 1: La figura 1 muestra la estructura química de éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 7-{2-[2-(2-{(S)-3-[2-[(1R,7aR)-1-((R)-4,5-dihidroxi-1,5-dimetil-hexil)-7a-metil-octahidro-inden-(4E)-iliden]-et-(Z)-iliden]-4-metilen-ciclohexiloxicarbonilamino}-etoxi)-etoxi]-etilcarbamoil]-heptanoico (éster NHS de ácido).

Figura 2: La figura 2 muestra el inmunoensayo total de vitamina D Elecsys® sin o con agente de bloqueo (primer agente de unión), respectivamente, en el reactivo R1. 25-hidroxivitamina D₃ (○, 25(OH)D₃); 24,25-dihidroxivitamina D₃ (●, 24,25(OH)2D₃).

La figura 2a muestra los resultados sin reactivo de bloqueo (primer agente de unión) mAb<24,25-dihidroxivitamina D₃>rK-IgG.

La figura 2b muestra los resultados con reactivo de bloqueo (primer agente de unión) para la eliminación de interferencias mAb<24,25-dihidroxivitamina D₃>rK-IgG (mAb<24,25(OH)2D₃>).

Figura 3: La correlación entre las mediciones de vitamina D del inmunoensayo total de vitamina D Elecsys® y CL-EM se muestra en las figuras 3a y 3b para dos conjuntos de muestras diferentes. Sin agente de bloqueo (○, sin primer agente de unión) y con agente de bloqueo (●, con primer agente de unión).

Ejemplo 1

Procedimientos para la síntesis de un reactivo de bloqueo para 24,25-dihidroxivitamina D₃

1.1 Síntesis de antígeno y conjugado de antígeno

Síntesis de éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 7-{2-[2-(2-{(S)-3-[2-[(1R,7aR)-1-((R)-4,5-dihidroxi-1,5-dimetil-hexil)-7a-metil-octahidro-inden-(4E)-iliden]-et-(Z)-iliden]-4-metilen-ciclohexiloxicarbonilamino}-etoxi)-etoxi]-etilcarbamoil]-heptanoico (éster NHS de ácido en la fig. 1)

La síntesis del material de partida 24,25-O-isopropiliden-24R,25-dihidroxivitamina D₃ se describe por Sestelo, Jose Perez; Cornelia, Ivan; De Una, Olga; Mourino, Antonio; Sarandeses, Luis A., Chemistry - A European Journal (2002), 8(12), 2747-2752. La estructura se muestra en la fig. 1.

Se secaron 100 mg del material de partida y 26,8 mg de DMAP en un matraz y se añadieron 20 ml de diclorometano. Después de la adición de 121 µl de trietilamina, se añadieron 86,7 mg de fosgeno como solución de tolueno al 20 %. Se agitó la solución durante 45 minutos bajo atmósfera inerte y se protegió de la luz a temperatura ambiente (TA; TA es conocida por el experto en la técnica como de 20 °C a 25 °C (de 68 °F a 77 °F) y se añadieron 324,6 mg de diaminodioxaoctano disueltos en 10 ml de diclorometano. Se agitó además la mezcla durante la noche en la misma condición. Se purificó el producto por HPLC preparativa. Rendimiento = 72 mg.

Se convirtieron 55 mg del derivado de amina en el éster NHS haciendo reaccionar con 168 mg de éster de bis N-hidroxisuccinimida del ácido octanodioico, 68 µl de trietilamina en acetonitrilo durante la noche a temperatura ambiente (TA). Se escindió el grupo protector por adición de aproximadamente 1 g de Dowex 50WXH y se agitó continuamente hasta que se completó la reacción. Se purificó el producto por HPLC preparativa. Rendimiento 16 mg. HPLC-ESI-EM: M⁺ = 844,7 Da

Síntesis del conjugado de antígeno:

Se disolvieron 5,63 mg del éster NHS descrito anteriormente en 500 µl de DMSO y se añadieron a una solución de

50 mg de KLH (hemocianina de lapa californiana, Sigma H 8283). Se ajustó el pH hasta pH= 8,3 y se agitó la solución durante la noche. Se purificó la mezcla en una celda agitada Amicon.

Análítica de grupos amino: proporción antígeno-KLH ap. 500:1

1.2 Generación de anticuerpos frente a 24,25-dihidroxitamina D₃

Desarrollo de anticuerpos con PCR de linfocitos B de conejo:

Para la generación de anticuerpos frente a 24,25-dihidroxitamina D₃, se inmunizaron conejos ZiKa de 16 semanas de edad con 24,25-dihidroxitamina D₃ acoplada a KLH. Se sometieron todos los conejos a inmunizaciones repetidas. En los primeros meses, se inmunizaron los animales semanalmente. A partir del segundo mes en adelante, se inmunizaron los animales una vez al mes. Para cada inmunización, se disolvieron 500 µg de 24,25-dihidroxitamina D₃ acoplada a KLH en 1 ml de NaCl 140 mM y se emulsionó en 1 ml de CFA. Se evalúa el desarrollo de los valores los días 45 y 105 después del inicio de la inmunización. Cuando los valores frente al inmunógeno son detectables por ELISA, se desarrollan anticuerpos por clonación de linfocitos B como se describe en Seeber *et al.* 2014. Se produce IgG de conejo de longitud completa recombinante por transfección transitoria de células HEK293.

Análisis de los valores:

Para la determinación de los valores de suero frente a 24,25-dihidroxitamina D₃, se acopló una variante biotinilada de 24,25-dihidroxitamina D₃ a placas de 96 pocillos recubiertos con estreptavidina. Se recoge una pequeña cantidad de suero de cada conejo el día 45 y el día 105 después del inicio de la campaña de inmunización. Se inmovilizó la 24,25-dihidroxitamina D₃ biotinilada en la superficie de placa a una concentración de 15 ng/ml. Se diluyeron los sueros de cada conejo en PBS con BSA al 1 % y se añadieron las diluciones a las placas. Se sometieron a prueba los sueros a las diluciones 1:300, 1:900, 1:2700, 1:8100, 1:24300, 1:72900, 1:218700 y 1:656100. Se detectó el anticuerpo unido con un anti-Fcγ de conejo caprino F(ab')₂ marcado con HRP (Dianova) y ABTS (Roche) como sustrato.

Ejemplo 2

Aplicación de un reactivo de bloqueo para 24,25-dihidroxitamina D₃ a un ensayo de unión

Dependiendo del procedimiento de ensayo se puede añadir un reactivo de bloqueo (por ejemplo un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, una parte funcionalmente activa de un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo sintético (anticuerpo plástico)) que se une específicamente a 24,25-dihidroxitamina D₃ para el pretratamiento o reactivos de liberación, diluyentes de ensayo o tampones de ensayo poniéndolos en contacto con los compuestos de vitamina D en una muestra antes o conjuntamente con el componente de unión marcado respectivo (conjugado) del ensayo.

Como ejemplo se describe el bloqueo de 24,25-dihidroxitamina D₃ en el inmunoensayo total de vitamina D Elecsys®:

- Se añadieron 0,075 mg/ml de mAb<24,25-dihidroxitamina D₃>rK-IgG al reactivo R1 del inmunoensayo total de vitamina D Elecsys® que contiene el conjugado de proteína de unión a la vitamina D rutenilada.
- Se realizó la aplicación del ensayo total de vitamina D con series de dilución de 25-hidroxitamina D₃ (○, 25(OH)D₃) o bien 24,25-dihidroxitamina D₃ (●, 24,25(OH)2D₃) en una matriz sin metabolitos de vitamina D (Diluent Universal)
- La referencia (sin reactivo de bloqueo) mostró reactividad cruzada para 25-hidroxitamina D₃ y 24,25-dihidroxitamina D₃ (tabla 1 y fig. 2a)
- La aplicación de inmunoensayo con reactivo de bloqueo mostró reactividad cruzada reducida para 24,25-dihidroxitamina D₃ mientras que la especificidad por 25-hidroxitamina D₃ no se vio afectada (tabla 1 y fig. 2b)

Tabla 1: El efecto de mAb<24,25-dihidroxitamina D₃>rK-IgG sobre la dinámica de señal (mostrada como B/B0) para 25-hidroxitamina D₃ (25(OH)D₃) y 24,25-dihidroxitamina D₃ (24,25(OH)2D3).

		Referencia ○		mAb<24,25(OH)2VitD3> ●	
		Señal (media)	B/B0	Señal (media)	B/B0
25(OH)VitD3	0 nmol/l	366'500		340'300	
	25 nmol/l	297'200	81 %	262'400	77 %
	50 nmol/l	217'500	59 %	214'000	63 %
	75 nmol/l	161'600	44 %	167'500	49 %
	100 nmol/l	135'600	37 %	142'700	42 %
	125 nmol/l	108'900	30 %	113'900	33 %
	150 nmol/l	98'860	27 %	102'500	30 %
	200 nmol/l	79'820	22 %	78'620	23 %
	250 nmol/l	67'020	18 %	60'020	18 %
	300 nmol/l	58'210	16 %	50'500	15 %
	374 nmol/l	50'550	14 %	42'740	13 %
	499 nmol/l	41'190	11 %	34'610	10 %
24,25(OH)2VitD3	0 nmol/l	399'400		342'100	
	24 nmol/l	268'100	67 %	325'200	95 %
	48 nmol/l	213'600	53 %	316'400	92 %
	72 nmol/l	147'700	37 %	313'000	91 %
	96 nmol/l	127'300	32 %	309'900	91 %
	120 nmol/l	103'700	26 %	299'600	88 %
	144 nmol/l	98'420	25 %	301'200	88 %
	192 nmol/l	85'250	21 %	292'900	86 %
	240 nmol/l	71'560	18 %	279'100	82 %
	288 nmol/l	61'070	15 %	260'900	76 %
	360 nmol/l	51'180	13 %	252'300	74 %
	480 nmol/l	45'010	11 %	227'300	66 %

5 El efecto positivo del mAb<24,25-dihidroxitamina D₃>rK-IgG también se pudo observar independientemente para dos conjuntos de muestras diferentes en la correlación mejorada para CL-EM/EM que es específica para 25-hidroxitamina D₂ y 25-hidroxitamina D₃ solo (fig. 3a y 3b). Sin agente de bloqueo (○) la correlación es de 0,92 (izquierda) o 0,79 (derecha). Después de añadir el mAb<24,25-dihidroxitamina D₃>rK-IgG (●, 10 mAb<24,25(OH)2D3>) la correlación mejoró hasta 0,94 (izquierda) o 0,90 (derecha), respectivamente.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para determinar la concentración de 25-hidroxivitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D₃, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - a) proporcionar una muestra obtenida de un sujeto que comprende un compuesto de vitamina D unido a la proteína de unión a la vitamina D,
 - b) mezclar la muestra
 - (ba) con un primer agente de unión que se une específicamente a 24,25-dihidroxivitamina D₃ y no se une a 25-hidroxivitamina D, formando de este modo un complejo entre el primer agente de unión y 24,25-dihidroxivitamina D₃;
 - (bb) con un segundo agente de unión que se une a 25-hidroxivitamina D, formando de este modo un complejo entre el segundo agente de unión y 25-hidroxivitamina D;
 - c) medir el complejo formado en (bb), determinando de este modo la concentración de 25-hidroxivitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D₃.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra es sangre, suero o plasma.
3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que el compuesto de vitamina D presente en la muestra unido a la proteína de unión a la vitamina D se libera de la proteína de unión a la vitamina D antes de la etapa (b) con un reactivo de liberación.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que
 - $K_d(\text{primer agente de unión}) / K_d(\text{segundo agente de unión})$ es de 10 o menos; y/o
 - $\text{Conc}(\text{primer agente de unión}) / \text{Conc}(\text{segundo agente de unión})$ es de como máximo 200;
 en el que $K_d(\text{primer agente de unión})$ es la afinidad del primer agente de unión por 24,25-dihidroxivitamina D₃ y $K_d(\text{segundo agente de unión})$ es la afinidad del segundo agente de unión por 25-hidroxivitamina D, y
 en el que $\text{Conc}(\text{primer agente de unión})$ y $\text{Conc}(\text{segundo agente de unión})$ son las concentraciones molares del primer agente de unión y el segundo agente de unión, respectivamente, en la etapa b), en particular en el que $\text{Conc}(\text{primer agente de unión})$ está en el intervalo de $1 \cdot (1 \text{ a } 10) \text{ nmol/l}$ a $200 \cdot (1 \text{ a } 10) \text{ nmol/l}$, y/o $\text{Conc}(\text{segundo agente de unión})$ está en el intervalo de desde 1 a 10 nmol/l.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que
 - la K_d del primer agente de unión para la unión a 24,25-dihidroxivitamina D₃ es de 10^{-8} mol/l o menos; y/o
 - la K_d del segundo agente de unión para la unión a 25-hidroxivitamina D es de 10^{-8} mol/l o menos.
6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el procedimiento se selecciona del grupo que consiste en un inmunoensayo enzimático (ELISA), inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA), radioinmunoensayo (RIA) e inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA).
7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la 25-hidroxivitamina D se selecciona del grupo que consiste en 25-hidroxivitamina D₂, 25-hidroxivitamina D₃ y 3-epi-25-hidroxivitamina D.
8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el primer agente de unión es un anticuerpo monoclonal o una parte funcionalmente activa del anticuerpo monoclonal, y el segundo agente de unión es una proteína de unión a la vitamina D o una parte funcionalmente activa de la proteína de unión a la vitamina D.
9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el primer agente de unión tiene al menos la misma afinidad de unión por 24,25-dihidroxivitamina D₃ que el segundo agente de unión.
10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el segundo agente de unión no puede liberar la 24,25-dihidroxivitamina D₃ unida al primer agente de unión.

11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el primer agente de unión no tiene reactividad cruzada significativa para 25-hidroxivitamina D.
- 5 12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el procedimiento de detección *in vitro* se lleva a cabo como ensayo competitivo.
13. Uso de un procedimiento *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para determinar la concentración de 25-hidroxivitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D₃.
- 10 14. Uso de un primer agente de unión que se une específicamente a 24,25-dihidroxivitamina D₃ y no se une a 25-hidroxivitamina D, y un segundo agente de unión que se une a 25-hidroxivitamina D en un procedimiento *in vitro* para determinar la concentración de 25-hidroxivitamina D sin interferencia por 24,25-dihidroxivitamina D₃ en una muestra obtenida de un sujeto.
- 15 15. Un kit para realizar el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que comprende al menos
 - 20 a) un primer agente de unión que se une específicamente a 24,25-dihidroxivitamina D₃ y no se une a 25-hidroxivitamina D, en el que el primer agente de unión es un anticuerpo monoclonal o una parte funcionalmente activa del anticuerpo monoclonal, y
 - b) un segundo agente de unión que se une a 25-hidroxivitamina D, en el que el segundo agente de unión es una proteína de unión a la vitamina D.

Figura 1

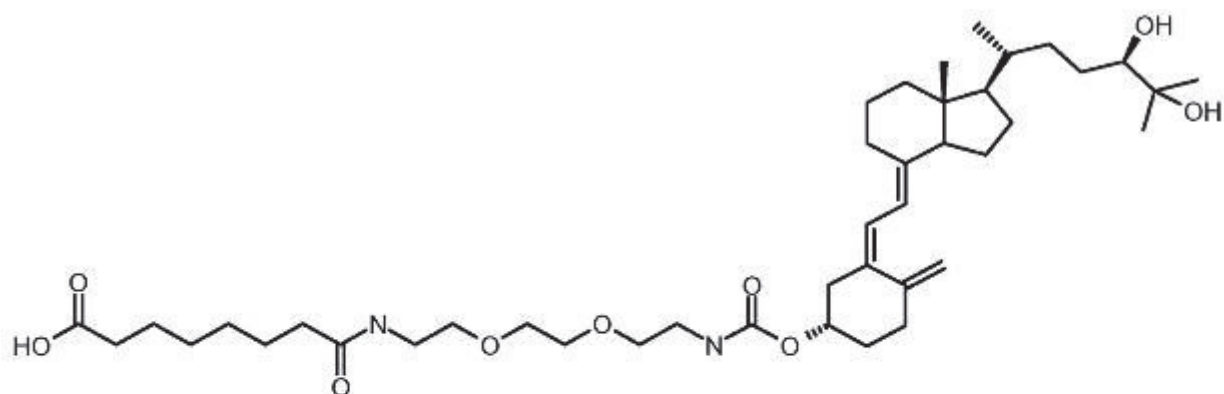


Figura 2a

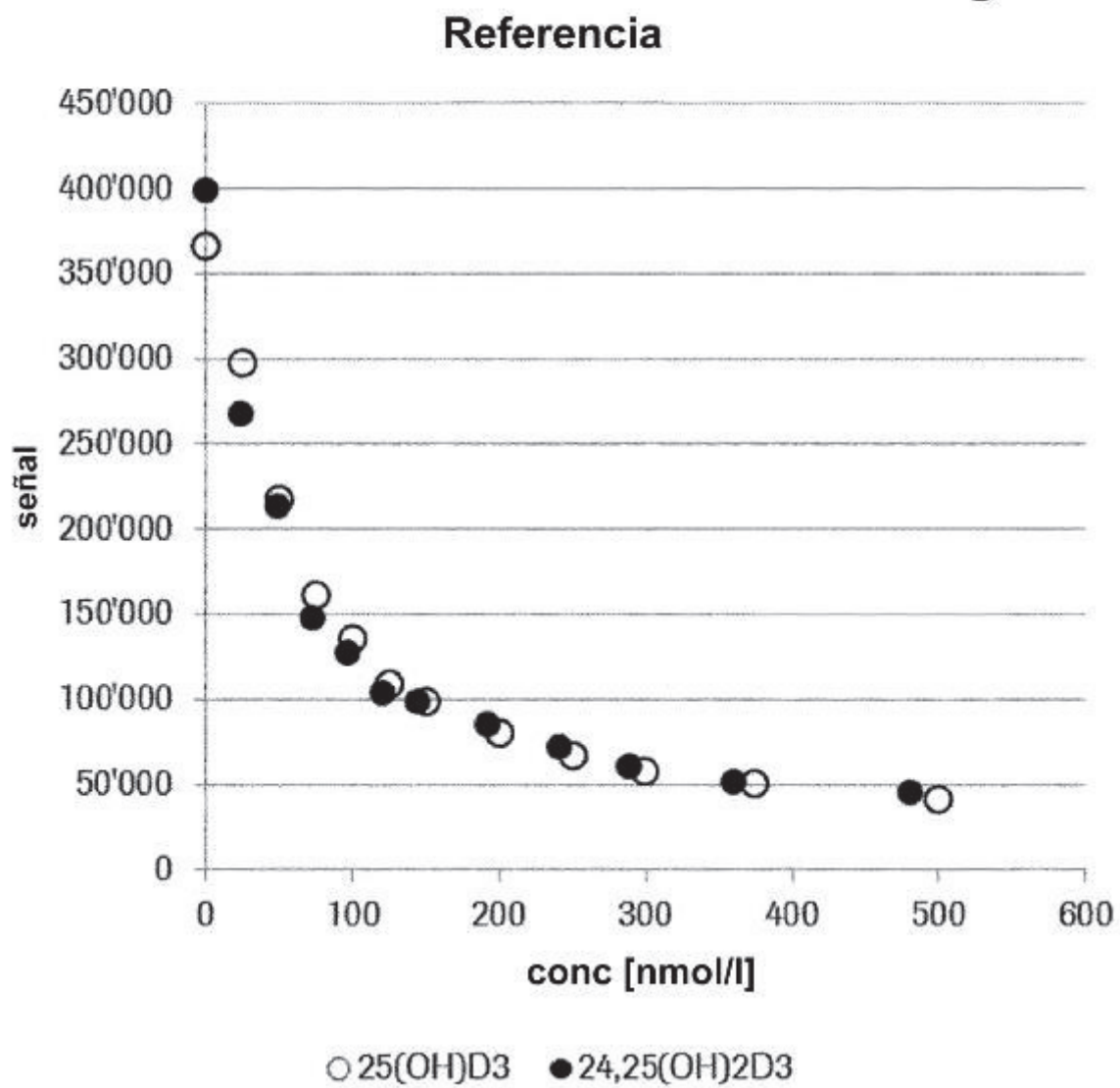


Figura 2b

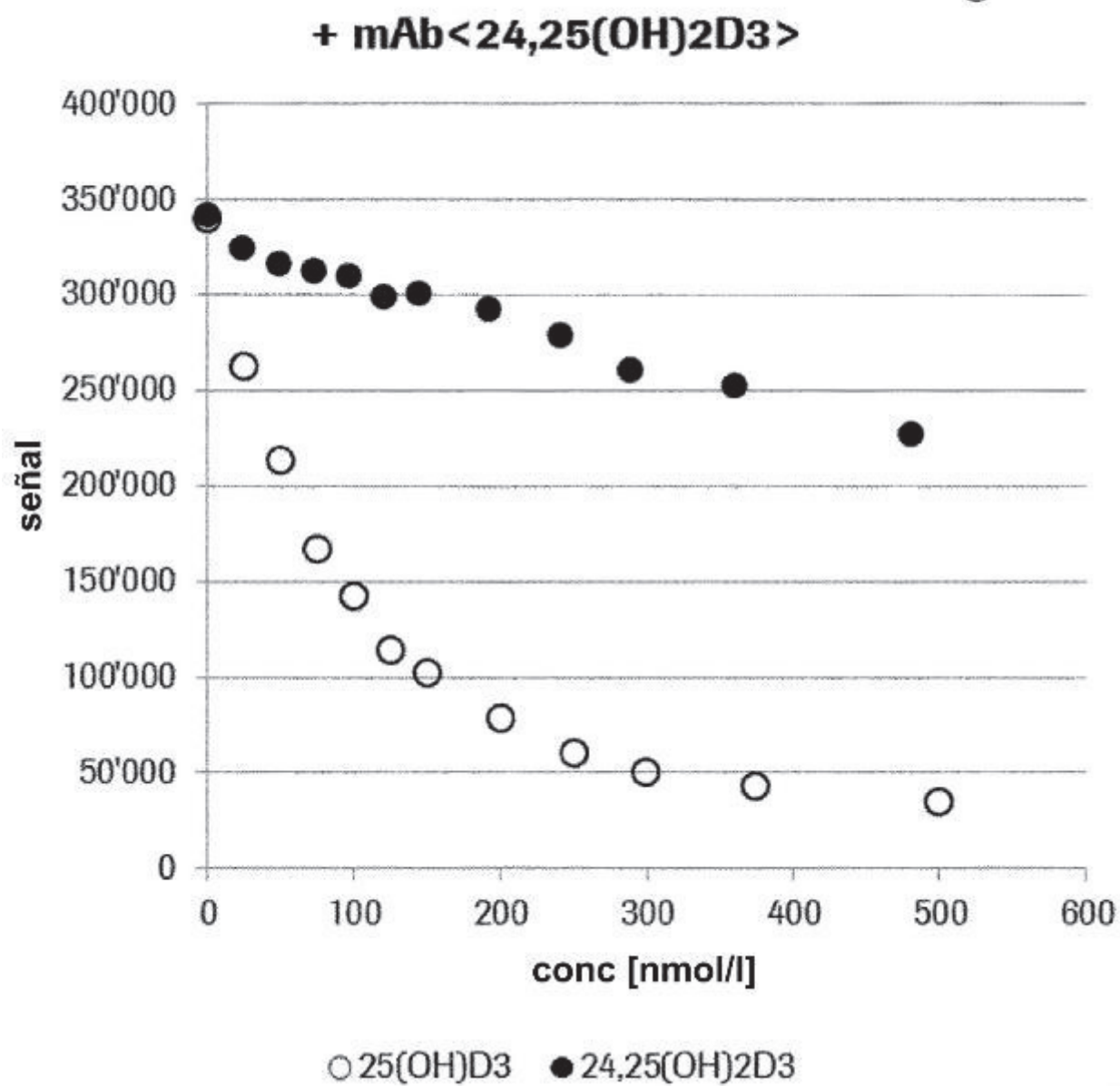


Figura 3a

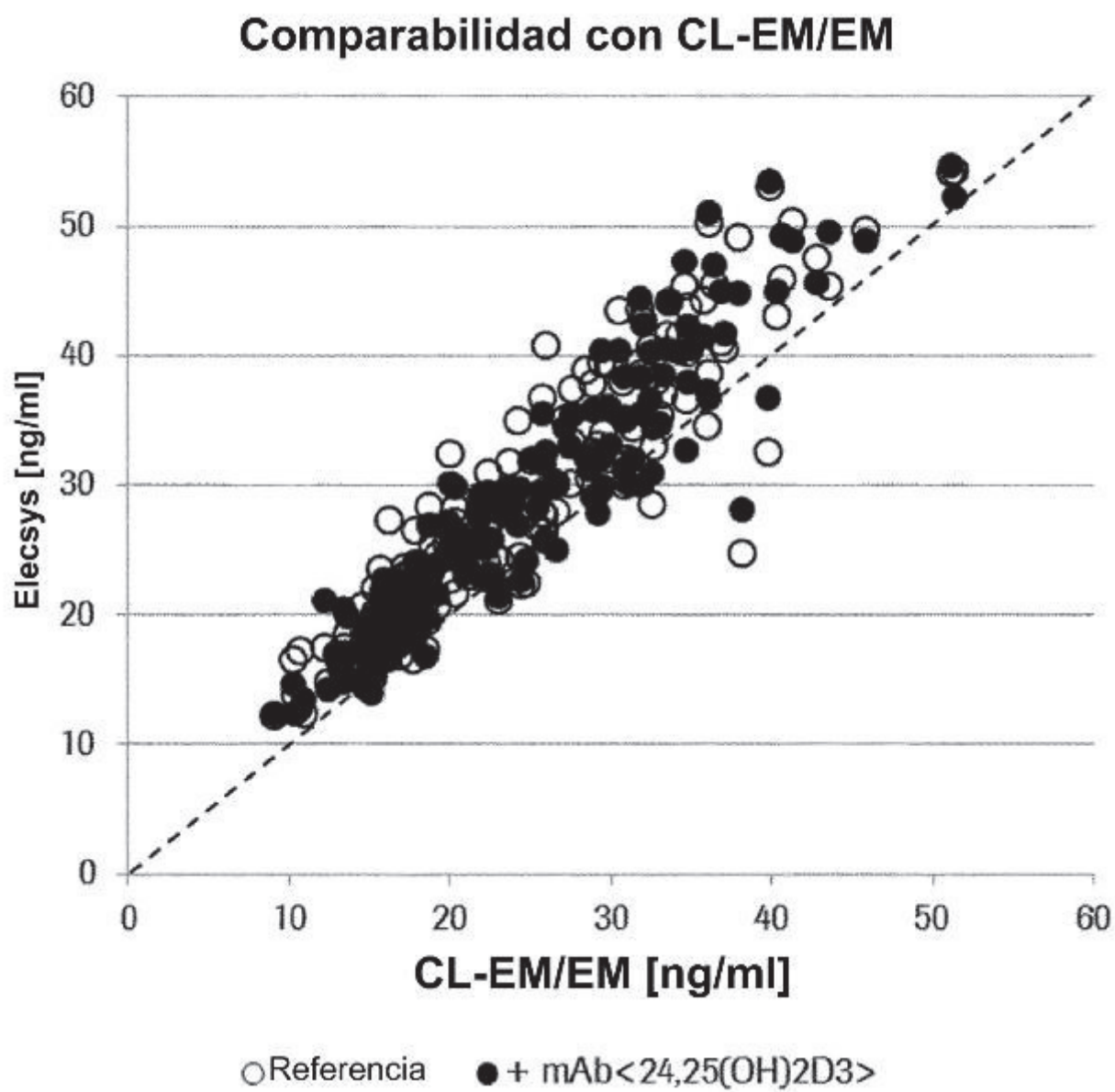


Figura 3b

