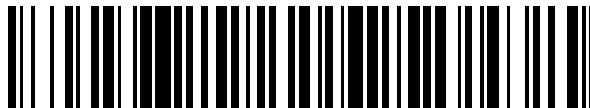


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 254**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/44** (2006.01)

**G01N 33/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2015 PCT/US2015/036900**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2015 WO15200178**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2015 E 15812575 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 3161006**

54 Título: **Ensayos para epímeros de vitamina D**

30 Prioridad:

**27.06.2014 US 201462018001 P**

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

**14.11.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WEI, TIE QUAN;  
TENG, ZHU;  
MAREEVA, TATIANA;  
LI, JIE;  
DRINAN, MARTIN A.;  
BAHAR, IZAK y  
SHARMA, MANOJ**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 731 254 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

Ensayos para epímeros de vitamina D

Antecedentes

5 Esta invención se refiere a composiciones, métodos y kits para determinar la presencia y/o cantidad de analitos epiméricos de vitamina D y metabolitos de los mismos en una muestra sospechosa de contener los mismos.

10 Muchos compuestos de moléculas pequeñas o haptenos tales como, por ejemplo, fármacos y vitaminas, existen en formas isoméricas, de las cuales solamente una forma es activa. Para obtener una medición precisa de la forma activa de un analito, debe abordarse la presencia del isómero no activo del analito. Las mediciones de ambas formas isoméricas de un analito, es decir, las formas activas y no activas, pueden llevar a imprecisiones que pueden ser perjudiciales para un individuo dependiendo de la función de la forma activa del analito. La evaluación precisa del nivel de cada uno de un par de analitos isoméricos en muestras biológicas es importante, especialmente cuando solo uno de los isómeros está activo y las mediciones que incluyen la cantidad del isómero no activo distorsionan el nivel del analito en una muestra. Por ejemplo, medir los niveles de vitamina D en muestras biológicas es importante ya que la deficiencia de vitamina D está relacionada con una serie de trastornos en los mamíferos. En los infantes, por ejemplo, 15 las mediciones de vitamina D que incluyen cantidades de isómeros 3-epi pueden llevar a una evaluación inexacta de los niveles de vitamina D en el infante, lo que a su vez puede conducir a una falta de suplementos adecuados. Es importante medir la forma activa de la vitamina D para que un infante pueda recibir la terapia adecuada de vitamina D, si es necesario. Por ejemplo el artículo de J.M.W. van den Ouweland et al., "C3-epimer cross-reactivity of automated 25-hydroxyvitamin D immunoassay ", en: Ned. Tijdschr. Klin. Chem. Labgeneesk 38 [2013] p. 136-138, divulga los resultados de una investigación en la que se analizó la reactividad cruzada de 3-epi-25-hidroxi-vitamina D<sub>3</sub> y su efecto en la medición total de 25-hidroxi-vitamina D.

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

30 Tanto la vitamina D<sub>3</sub> dietética como la sintetizada intrínsecamente deben someterse a una activación metabólica para generar metabolitos bioactivos. En los humanos, la etapa inicial de la activación de la vitamina D<sub>3</sub> se produce principalmente en el hígado e implica la hidroxilación para formar el metabolito intermedio 25-hidroxicolecalciferol. El calcidiol es la principal forma de vitamina D<sub>3</sub> en el sistema circulatorio. La vitamina D<sub>2</sub> también experimenta una activación metabólica similar a la 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub>. En conjunto, estos compuestos se denominan 25-hidroxivitamina D (abreviado 25 (OH)D) y son los principales metabolitos que se miden en el suero para determinar el estado de la vitamina D; 25 (OH)Dy sus epímeros son ambas pre-hormonas que deben convertirse en 1,25 (OH)D para ejercer funciones biológicas. La comparación de la bioactividad de 1,25 (OH)D frente a la de 3-epi-1,25 (OH)D es compleja. Por ejemplo, la Patente U.S. N° 6.787.660 enseña un método para determinar 25-hidroxi-vitamina D y 1,25-dihidroxivitamina D en muestras. En la solicitud de patente U.S. No 2013/0059825 se proporciona un informe adicional para cuantificar la vitamina D y sus derivados. La solicitud se dirige a un ensayo que detecta y/o cuantifica los derivados de la vitamina D y la vitamina D presentes en muestras biológicas ya sea en forma libre o unida a la proteína de unión a la vitamina D.

45 Los compuestos de vitamina D 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> y 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> son epiméricos en la posición 3, con los epímeros que se designan como 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> y 3-epi-25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> y 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> y 3-epi-25-hidroxivitamina D<sub>2</sub>, respectivamente. Solamente uno de los epímeros de cada uno de estos compuestos epiméricos, a saber, 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> y 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub>, respectivamente, está activo. Las estructuras para los epímeros de 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> y 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> se exponen en la Fig. 1.

50 El establecimiento de los niveles de vitamina D en muestras biológicas es importante ya que la deficiencia de vitamina D está relacionada con una serie de trastornos en los mamíferos. Existe la necesidad de reactivos y métodos para la determinación precisa y sensible de concentraciones de vitamina D y formas epiméricas de vitamina D, y sus metabolitos en las muestras.

Resumen

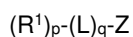
55 Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos aquí se dirigen a métodos para determinar una cantidad de un analito epimérico de vitamina D en una muestra sospechosa de contener el analito epimérico de vitamina D. Se proporciona una combinación en un medio de ensayo que incluye la muestra y un asociado de unión al epímero de la vitamina D que es específico para los epímeros del analito de la vitamina D. El asociado de unión es un anticuerpo o un aptámero. El medio de ensayo se incuba bajo condiciones para la unión del asociado de unión del epímero de la vitamina D a los epímeros del analito de la vitamina D para formar un complejo unido al asociado de unión al epímero de la vitamina D. La cantidad de complejo unido al asociado de unión al epímero de la vitamina D se determina y se

## ES 2 731 254 T3

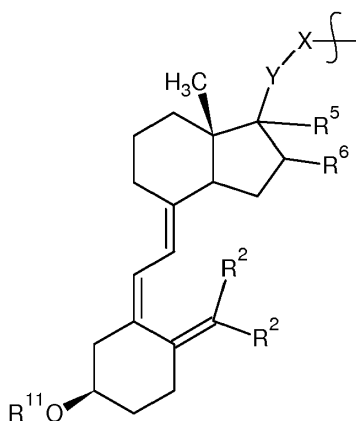
relaciona con la cantidad de analito epimérico de vitamina D en la muestra. El analito epimérico de vitamina D es 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>2</sub> o 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>3</sub>.

Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento se dirigen a un método como se establece anteriormente, en el que el asociado de unión al epímero de la vitamina D se genera contra un compuesto de la Fórmula I

5



en donde R<sup>1</sup> =



o H, en donde al menos uno de R<sup>1</sup> no es H,

10 Y es O, S, CR, o NR<sup>4</sup>,

X es -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>-C(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-C(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>-C(O)-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-C(O)-, -NR<sup>3</sup>-C(O)-,

R es independientemente H o alquilo,

R<sup>2</sup> es independientemente H o alquilo,

15 R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son independientemente H o alquilo, o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se pueden tomar juntos para formar un enlace, o R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> se pueden tomar juntos para formar un enlace,

R<sup>11</sup> es H, alquilo, o acilo,

n es un entero de 1 a 10,

w es un entero de 0 a 10,

x es un entero de 1 a 10,

20 y es un entero de 1 a 10,

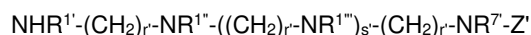
p es un entero de 1 a 10,

L es un grupo enlazante,

q es 0 o 1, y

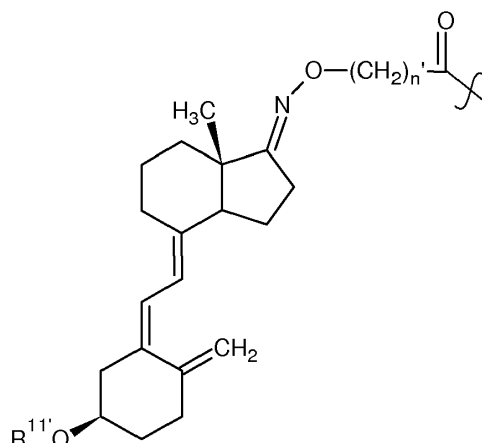
25 Z es un portador inmunogénico de poli(aminoácido) o un portador inmunogénico no poli(aminoácido); y que incluye mezclas de dos o más de los compuestos anteriores.

Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento se dirigen a un método como se expuso anteriormente, en el que el asociado de unión al epímero de la vitamina D se genera contra un compuesto de la Fórmula II:



30 en donde

R<sup>1</sup>, R<sup>1''</sup> o R<sup>1'''</sup> se seleccionan cada uno independientemente de



y H,

en donde al menos uno de R<sup>1'</sup>, R<sup>1''</sup> o R<sup>1'''</sup> no es H,

n' es un entero de 1 a 10,

5 r' es independientemente un entero de 1 a 10,

s' es un entero de 1 a 10,

R<sup>7'</sup> es H o alquilo,

R<sup>11'</sup> es H, alquilo, o acilo, y

10 Z' es un portador inmunogénico de poli(aminoácido) o un portador inmunogénico no poli(aminoácido); y que incluye mezclas de dos o más de los compuestos anteriores.

15 Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos aquí se dirigen a métodos para determinar una cantidad de un analito epimérico de vitamina D en una muestra sospechosa de contener el analito epimérico de vitamina D. La muestra y un anticuerpo de captura que es un anticuerpo epímero de la vitamina D que es específico para los epímeros del analito de la vitamina D se proporcionan en combinación en un medio de ensayo. El medio de ensayo se incuba bajo condiciones para la unión del anticuerpo epímero de vitamina D a los epímeros del analito de vitamina D. El complejo unido al anticuerpo del epímero de la vitamina D se combina con un anticuerpo de detección que se une al analito epimérico de la vitamina D en el complejo unido al anticuerpo del epímero de la vitamina D en el que el anticuerpo de detección comprende un miembro de un sistema de producción de señales. La señal producida por el sistema productor de señal se mide y se relaciona con la cantidad de analito epimérico de vitamina D en la muestra.

20 Breve descripción de los dibujos.

Los dibujos proporcionados en este documento no están a escala y se proporcionan con el propósito de facilitar la comprensión de ciertos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento y se proporcionan a modo de ilustración y no de limitación en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

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

La Fig. 2 es un diagrama esquemático de una síntesis de compuestos de acuerdo con ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento.

La Fig. 3 es un diagrama esquemático de una síntesis de compuestos de acuerdo con ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento.

30 La Fig. 4 es un diagrama esquemático de una síntesis de compuestos de acuerdo con ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento.

La Fig. 5 es un diagrama esquemático de una síntesis de compuestos de acuerdo con ejemplos de acuerdo con los principios descritos aquí (no de acuerdo con la presente invención).

35 La figura 6 es un diagrama esquemático de una síntesis de compuestos de acuerdo con ejemplos de acuerdo con los principios descritos aquí (no de acuerdo con la presente invención).

La Fig. 7 es un diagrama esquemático de una síntesis de compuestos de acuerdo con ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento.

La Fig. 8 es un diagrama esquemático de una síntesis de compuestos de acuerdo con ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento.

- 5 La Fig. 9 ilustra una comparación de curvas estándar generadas usando reactivos con y sin el anticuerpo anti-3-epímero-VD agregado.

La Fig. 10 es una curva estándar para un inmunoensayo para la determinación de 3-epi-25(OH)D en muestras que usan anticuerpos anti-3-epímero-VD.

#### Descripción detallada de realizaciones específicas

- 10 Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos aquí se dirigen a métodos para determinar una cantidad de un analito epimérico de vitamina D en una muestra que se sospecha que contiene el analito epimérico de vitamina D, en donde el analito epimérico de vitamina D es 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>2</sub> o 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>3</sub>. Se proporciona una combinación en un medio de ensayo que incluye la muestra y un asociado de unión al epímero de la vitamina D que es un anticuerpo o un aptámero que es específico para los epímeros del analito de la vitamina D. Como
- 15 se explica con más detalle a continuación, el ensayo puede ser homogéneo o heterogéneo, competitivo o no competitivo. En algunos ejemplos, dependiendo de la naturaleza del ensayo, se incluye un reactivo que es un análogo de la vitamina D, al cual se puede unir el asociado de unión del epímero de la vitamina D, y en algunos ejemplos se emplea un segundo asociado de unión que es específico para el analito epimérico de vitamina D. El medio de ensayo se incuba bajo condiciones para la unión del asociado de unión del epímero de la vitamina D al analito epimérico de
- 20 vitamina D para formar un complejo unido al asociado de unión del epímero de la vitamina D, es decir, un complejo que incluye el asociado de unión del epímero de la vitamina D. La cantidad de complejo unido al asociado de unión de epímero de la vitamina D se determina y se relaciona con la cantidad del analito epimérico de vitamina D en la muestra.

#### Descripción general de los ensayos para epímeros de vitamina D

- 25 Como se mencionó anteriormente, algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento están dirigidos a los métodos para determinar uno o ambos de la presencia y la cantidad de un analito epimérico de vitamina D en una muestra que se sospecha que contiene el analito epimérico de vitamina D, en donde el analito de vitamina D es 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>2</sub> o 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>3</sub>, y se puede denominar aquí como "ensayos para epímeros de vitamina D". En cualquiera de los ejemplos discutidos en el presente documento, un asociado de unión tal como, por ejemplo, un anticuerpo o un aptámero de acuerdo con los principios descritos en el presente documento
- 30 que es específico para uno o más epímeros de vitamina D puede emplearse en un ensayo para un epímero de un analito de la vitamina D.

- La expresión "vitamina D" se refiere a uno o más de 25-hidroxitamina D; calcidiol; 1,25-dihidroxi vitamina D<sub>2</sub>; 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>; 1,25-dihidroxi vitamina D<sub>4</sub>; 1,25-dihidroxi vitamina D<sub>5</sub>; y 1,25-dihidroxi vitamina D<sub>6</sub>; incluyendo formas epiméricas y metabolitos de todos los anteriores. Por lo tanto, el analito de vitamina D incluye la vitamina D y
- 35 los epímeros de la vitamina D como se definió anteriormente. Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos aquí están dirigidos a métodos para determinar una o ambas de la presencia y la cantidad de formas epiméricas de vitamina D en una muestra sospechosa de contener formas epiméricas de vitamina D (es decir, de contener 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>3</sub> o 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>2</sub>) y pueden denominarse en el presente documento como "ensayos para epímeros de vitamina D".

- 40 En un ejemplo, a modo de ilustración y no de limitación, de un método para determinar un analito epimérico de vitamina D, se proporciona una combinación que comprende la muestra y un anticuerpo para un epímero de un analito de vitamina D donde el anticuerpo se produce de acuerdo con los principios aquí descritos. La combinación puede comprender además un conjugado que comprende un análogo de vitamina D y un miembro de un sistema de producción de señales.

- 45 Como se mencionó anteriormente, la muestra y los reactivos se proporcionan "en combinación en el medio". Si bien el orden de adición al medio puede variar para formar la combinación, habrá ciertas preferencias para algunas realizaciones de los formatos de ensayo descritos en este documento. En un ejemplo, a modo de ilustración y no de limitación, el orden de adición es agregar todos los materiales simultáneamente y determinar el efecto que el medio de ensayo tiene sobre la señal como en un ensayo homogéneo. En otro ejemplo, a modo de ilustración y no de
- 50 limitación, cada uno de los reactivos, o grupos de reactivos, se pueden combinar secuencialmente. En algunas realizaciones, una etapa de incubación puede estar implicada subsecuente a cada adición como se discutió anteriormente. En ensayos heterogéneos, las etapas de separación y lavado también pueden emplearse después de una o más etapas de incubación.

- 55 La expresión "análogo de la vitamina D" se refiere a un compuesto que compite con un analito epimérico de vitamina D para un receptor como un anticuerpo para el analito epimérico de vitamina D. El análogo de la vitamina D puede ser una vitamina D modificada donde la modificación proporciona medios para unir la vitamina D a otra molécula como, por ejemplo, un soporte, un marcador, una molécula pequeña o un asociado de unión para una molécula pequeña,

por ejemplo. El análogo de la vitamina D puede unirse a otra molécula directa o indirectamente por medio de un grupo de enlace. El análogo de la vitamina D puede ser, por ejemplo, una molécula relacionada estructuralmente con la vitamina D o la vitamina D conjugada con otra molécula a través de un grupo de enlace. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, un análogo de la vitamina D puede ser un compuesto de la Fórmula I en donde Z es una unidad estructural marcadora de poli(aminoácido) o una unidad estructural marcadora de no poli(aminoácido) o en donde Z es un portador inmunogénico donde tal compuesto de Fórmula I compite con un analito epimérico de vitamina D para unirse a un anticuerpo para la vitamina D epimérica.

La muestra que se va a analizar es una que se sospecha que contiene un analito de vitamina D. Las muestras pueden ser muestras biológicas o muestras no biológicas. Las muestras biológicas pueden ser de un sujeto mamífero o un sujeto no mamífero. Los sujetos mamíferos pueden ser, por ejemplo, humanos u otras especies animales. Las muestras biológicas incluyen fluidos biológicos tales como sangre entera, suero, plasma, esputo, fluido linfático, semen, moco vaginal, heces, orina, fluido espinal, saliva, excrementos, fluido cefalorraquídeo, lágrimas, moco y similares; tejido biológico, tal como cabello, piel, cortes o tejidos extirpados de órganos u otras partes del cuerpo; y así sucesivamente. En muchos casos, la muestra es sangre entera, plasma o suero. Las muestras no biológicas que incluyen, pero no se limitan a, flujos de desechos, por ejemplo, también pueden analizarse utilizando compuestos de acuerdo con los principios descritos en este documento.

La muestra puede prepararse en cualquier medio conveniente, que puede ser, por ejemplo, un medio de ensayo, que se discute más detalladamente a continuación. En algunos casos, se puede aplicar un tratamiento previo a la muestra tal como, por ejemplo, lisar células sanguíneas. En algunos ejemplos, tal tratamiento previo se realiza en un medio que no interfiere subsecuentemente con un ensayo.

La combinación en el medio se somete a condiciones para la unión del analito epimérico de vitamina D y el análogo de vitamina D al anticuerpo para que el analito epimérico de vitamina D forme un complejo. La cantidad del complejo se mide cuando la cantidad del complejo se relaciona con una o ambas de la presencia y la cantidad del analito epimérico de vitamina D en la muestra.

Un ensayo para un analito epimérico de vitamina D, en donde el analito epimérico de vitamina D es 3-epi-25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> o 3-epi-25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>, puede realizarse bien sea sin separación (homogénea) o con separación (heterogénea) de cualquiera de los componentes o productos del ensayo. Los ensayos heterogéneos usualmente implican uno o más pasos de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Los inmunoensayos pueden implicar reactivos marcados o no marcados. Los inmunoensayos que involucran reactivos no marcados generalmente comprenden la formación de complejos relativamente grandes que involucran uno o más anticuerpos preparados a partir de conjugados inmunogénicos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, métodos de inmunoprecipitación y aglutinación y técnicas correspondientes de dispersión de la luz tales como, por ejemplo, nefelometría y turbidimetría, para la detección de complejos de anticuerpos. Los inmunoensayos marcados incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayos de quimioluminiscencia, inmunoensayos enzimáticos, inmunoensayos de polarización por fluorescencia, radioinmunoensayos, ensayos de inhibición, ensayos de luminiscencia inducida y ensayos de canalización de oxígeno fluorescente, por ejemplo.

Un grupo general de inmunoensayos incluye inmunoensayos que utilizan una concentración limitada de un anticuerpo de acuerdo con los principios descritos en este documento. Otro grupo de inmunoensayos implica el uso de un exceso de uno o más de los reactivos principales tales como, por ejemplo, un exceso de un anticuerpo de acuerdo con los principios descritos en este documento. Otro grupo de inmunoensayos incluye ensayos homogéneos libres de separación en los cuales la señal de un análogo de vitamina D marcado se modula al unirse el análogo de vitamina D marcado a un anticuerpo producido de acuerdo con los principios descritos aquí, compitiendo así con un analito epimérico de vitamina D que puede estar presente en la muestra.

Como se mencionó anteriormente, los ensayos pueden realizarse sin separación (homogénea) o con separación (heterogénea) de cualquiera de los componentes o productos del ensayo. Los inmunoensayos homogéneos se ejemplifican mediante el ensayo EMIT® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, IL) divulgado en Rubenstein, et al., Patente U.S. No. 3,817,837, columna 3, línea 6 a columna 6, línea 64; métodos de inmunofluorescencia tales como los divulgados en Ullman, et al., Patente U.S. Nº 3,996,345, columna 17, línea 59, a columna 23, línea 25; inmunoensayos de canalización enzimática ("ECIA") como los descritos en Maggio et al., Patente U.S. Nº 4,233,402, columna 6, línea 25 a columna 9, línea 63; el inmunoensayo de polarización de fluorescencia ("FPIA") como se divulga, por ejemplo, en, entre otros, la Patente U.S. Nº 5,354,693; e inmunoensayos enzimáticos tales como el ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzima ("ELISA"). Ejemplos de ensayos heterogéneos son el radioinmunoensayo, divulgado en Yalow, et al., J. Clin. Invest. 39: 1157 (1960).

Otros inmunoensayos enzimáticos son el inmunoensayo mediado por un módulo enzimático ("EMMIA") discutido por Ngo and Lenhoff, FEBS Lett. (1980) 116: 285-288; el inmunoensayo de fluorescencia marcado con sustrato ("SLFIA") divulgado por Oellerich, J. Clin. Chem. Clinica Biochem. (1984) 22: 895-904; los inmunoensayos de donantes de enzimas combinados ("CEDIA") divulgados por Khanna, et al., Clin. Chem. Acta (1989) 185: 231-240; inmunoensayos homogéneos marcados con partículas, tales como inmunoensayos de inhibición turbidimétrica potenciada por partículas ("PETINIA"), inmunoensayo turbidimétrico potenciada por partículas ("PETIA"); el formato del ensayo de inmunoensayo mediado por dióxido de cromo de afinidad ("ACMIA"), que se describe en las patentes U.S. Nos.

7,186,518, 5,147,529, 5,128,103, 5,158,871, 4,661,408, 5,151,348, 5,302,532, 5,422,284, 5,447,870, y 5,451,148, 5,302,532, 5,422,284, 5,447,870, y 5,451,148.

5 Otros ensayos incluyen ensayos con marcadores de éster de acridinio, tales como los discutidos en las patentes U.S. Números 6,355,803; 6,673,560; 7,097,995 y 7,319,041. Un ejemplo particular de un ensayo con marcador de éster de acridinio es un inmunoensayo con marcador de éster de acridinio usando partículas paramagnéticas como una fase sólida (inmunoensayo "ADVIA"). Otros ensayos incluyen el inmunoensayo de partículas de sol ("SPIA"), el inmunoensayo de colorante disperso ("DIA"); el metaloinmunoensayo ("MIA"); los inmunoensayos de membrana enzimática ("EMIA"); y luminoimunoensayos ("LIA"). Otros tipos de ensayos incluyen ensayos de inmunosensores que involucran la monitorización de los cambios en las propiedades ópticas, acústicas y eléctricas del presente  
10 conjugado tras la unión del analito de vitamina D. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunosensores ópticos, ensayos de inmunosensores acústicos, ensayos de inmunosensores semiconductores, ensayos de inmunosensores de transductores electroquímicos, ensayos de inmunosensores potenciométricos, ensayos de electrodos amperométricos.

15 Los ensayos heterogéneos usualmente implican una o más etapas de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Una variedad de formatos de ensayos heterogéneos competitivos y no competitivos se divulgan en Davalian, et al., Patente U.S. N° 5,089,390, columna 14, línea 25 a columna 15, línea 9. En un ejemplo de un ensayo heterogéneo competitivo, un soporte que tiene un anticuerpo para un analito epimérico de vitamina D unido al mismo se pone en contacto con un medio que contiene la muestra sospechosa de contener el analito epimérico de vitamina D y un compuesto marcado de acuerdo con los principios descritos aquí como un análogo de vitamina D marcado. El  
20 analito epimérico de vitamina D de la muestra compite por unirse al anticuerpo para el analito epimérico de vitamina D con el análogo de vitamina D marcado. Después de separar el soporte y el medio, la actividad del marcador del soporte o el medio se determina mediante técnicas convencionales y se relaciona con la cantidad de analito epimérico de vitamina D en la muestra. En una variación del ensayo heterogéneo competitivo anterior, el soporte comprende un análogo de vitamina D como reactivo marcado y el anticuerpo de vitamina D epímero comprende un marcador.

25 En algunos ejemplos, una muestra para analizar se combina en un medio de ensayo con un anticuerpo para el analito epimérico de vitamina D y el análogo de vitamina D marcado. El medio se examina para determinar la presencia y la cantidad de un complejo que comprende el análogo de la vitamina D marcado y el anticuerpo para el analito epimérico de vitamina D, donde la presencia y/o la cantidad de tal complejo indica la presencia y/o la cantidad del analito epimérico de vitamina D en la muestra.

30 En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, la muestra a analizar se somete a un tratamiento previo para liberar el analito epimérico de vitamina D (como se definió anteriormente) de sustancias de unión endógenas tales como, por ejemplo, proteínas plasmáticas o séricas que se unen a la vitamina D. La liberación del analito epimérico de vitamina D a partir de sustancias de unión endógenas puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la adición de un agente de digestión o un agente de liberación o una combinación de un agente de digestión y un agente de liberación utilizado secuencialmente. El agente de digestión es uno que descompone las  
35 sustancias de unión endógenas para que ya no puedan unirse a la vitamina D. Tales agentes incluyen, pero no se limitan a, proteinasa K y proteinasa K y agentes desnaturizantes de proteínas tales como, por ejemplo, detergentes (dodecil sulfato de sodio, por ejemplo). Los agentes liberadores para liberar vitamina D de sustancias de unión endógenas incluyen, a modo de ilustración y sin limitación, agentes desnaturizantes ácidos tales como, por ejemplo, ácido salicílico, warfarina, ácidos sulfónicos, ácidos toluenosulfónicos, ácido naftalensulfónico, ácidos anilinaftalén sulfónicos (ANS). (Incluyendo, por ejemplo, ácido 1-anilinaftaleno-8-sulfónico (1,8-ANS) y ácido 8-anilinaftaleno-1-sulfónico (8-ANS)), ácidos salicílicos y derivados de los anteriores.

45 Las condiciones tales como, por ejemplo, la duración, la temperatura, el pH y la concentración del agente de liberación en el medio para llevar a cabo las acciones de digestión o liberación dependen de la naturaleza de las sustancias de unión endógenas, la naturaleza de la muestra y la naturaleza del agente liberador, por ejemplo. En general, las condiciones son suficientes para lograr el efecto o función deseados. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, una concentración efectiva de agente de liberación es de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 20 mg/ml, o de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 10 mg/ml, o de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 5 mg/ml, o aproximadamente 0.1 a aproximadamente 20 mg/ml, o  
50 aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 mg/ml, o aproximadamente 0.1 a aproximadamente 5 mg/ml, o aproximadamente 0.1 a aproximadamente 1 mg/ml. El pretratamiento de la muestra para liberar el analito de vitamina D de sustancias de unión endógenas se puede llevar a cabo como una etapa separada antes de realizar un ensayo o como una primera etapa en un ensayo. En cualquier caso, se pueden requerir uno o más reactivos para detener la acción del agente de digestión y/o el agente de liberación.

55 Las condiciones para realizar los ensayos incluyen llevar a cabo el ensayo en un medio acuoso regulado a un pH moderado, generalmente el que proporciona una sensibilidad óptima del ensayo. El medio acuoso puede ser únicamente agua o puede incluir de 0.1 a aproximadamente 40 por ciento en volumen de un cosolvente. El pH para el medio estará en el rango de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, o en el rango de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, o en el rango de aproximadamente 6.5 a aproximadamente 9.5, por ejemplo. El pH usualmente  
60 será un compromiso entre la unión óptima de los miembros de unión de cualquier par de unión específica, el pH óptimo para otros reactivos del ensayo, tales como los miembros del sistema productor de señal, y así sucesivamente. Se

pueden usar varios reguladores para lograr el pH deseado y mantener el pH durante el ensayo. Los reguladores ilustrativos incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, borato, fosfato, carbonato, TRIS, barbital, PIPES, HEPES, MES, ACES, MOPS y BICINE, por ejemplo. El regulador particular empleado no es crítico, pero en un ensayo individual puede preferirse uno u otro regulador.

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

- 10 Se pueden aplicar uno o más períodos de incubación al medio en uno o más intervalos, incluyendo cualquiera de los intervalos entre las adiciones de diversos reactivos empleados en un ensayo que incluyen los mencionados anteriormente. El medio usualmente se incuba a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que se produzca la unión de diversos componentes de los reactivos y la unión de un analito epimérico de vitamina D en la muestra. Las temperaturas moderadas se emplean normalmente para llevar a cabo el método y, usualmente, temperatura constante, preferiblemente, temperatura ambiente, durante el período de la medición. En algunos ejemplos, las temperaturas de incubación varían de aproximadamente 5° a aproximadamente 99 °C, o de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 70 °C, o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 45 °C, por ejemplo. El período de tiempo para la incubación, en algunos ejemplos, es de aproximadamente 0.2 segundos a aproximadamente 24 horas, o de aproximadamente 1 segundo a aproximadamente 6 horas, o de aproximadamente 2 segundos a aproximadamente 1 hora, o de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 15 minutos, por ejemplo. El período de tiempo depende de la temperatura del medio y la tasa de unión de los diversos reactivos, que está determinada por la constante de la tasa de asociación, la concentración, la constante de unión y la constante de la tasa de disociación.

- 20 En un ejemplo de un método para determinar un analito epimérico de vitamina D en una muestra que se sospecha que contiene el analito epimérico de vitamina D (como se definió anteriormente), se proporciona una combinación en un medio donde la combinación incluye la muestra, un agente de liberación (si el la muestra no ha sido pretratada para liberar el analito epimérico de vitamina D a partir de sustancias de unión endógenas), un anticuerpo para el analito epimérico de vitamina D y un análogo de vitamina D marcado donde el marcador es un marcador de poli(aminoácido) o un marcador de no poli( aminoácido). El medio se examina para determinar uno o ambos de la presencia y la cantidad de uno o ambos de un complejo que comprende el analito epimérico de vitamina D y el anticuerpo para el analito epimérico de vitamina D o un complejo que comprende el análogo de vitamina D marcado y el anticuerpo para el analito epimérico de vitamina D. La presencia y/o la cantidad de uno o ambos de los complejos indica la presencia y/o la cantidad del analito epimérico de vitamina D en la muestra.

- 30 Algunos ensayos conocidos utilizan un sistema de producción de señales (sps) que emplea miembros primero y segundo de sps. La designación "primero" y "segundo" es completamente arbitraria y no pretende sugerir ningún orden o clasificación entre los miembros del sps ni ningún orden de adición de los miembros del sps en los métodos actuales. Los miembros de sps pueden estar relacionados en que la activación de un miembro de los sps produce un producto tal como, por ejemplo, luz o un producto activado, que da como resultado la activación de otro miembro del sps.

- 40 En algunas realizaciones de ensayos, los miembros del sps comprenden un sensibilizador tal como, por ejemplo, un fotosensibilizador y una composición quimioluminiscente en la que la activación del sensibilizador da como resultado un producto que activa la composición quimioluminiscente. El segundo miembro de sps usualmente genera una señal detectable que se relaciona con la cantidad del miembro de sps unido y/o no unido, es decir, la cantidad de miembro de sps unido o no unido al analito de vitamina D que se detecta o a un compuesto de acuerdo con los principios descrito aquí. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, uno de los reactivos sensibilizadores o los reactivos quimioluminiscentes comprende el presente reactivo compuesto.

- 50 En un ejemplo particular, se puede emplear un inmunoensayo de luminiscencia inducida. El inmunoensayo de luminiscencia inducida se menciona en la patente U.S. Nº 5,340,716 (Ullman). En una metodología, el ensayo usa una partícula que tiene asociado con el mismo un fotosensibilizador en el que un análogo de la vitamina D se une a la partícula (reactivo compuesto de partículas). El reactivo quimioluminiscente comprende un anticuerpo para el analito epimérico de vitamina D. El analito epimérico de vitamina D compete con el reactivo compuesto de partículas para unirse al anticuerpo para el analito epimérico de vitamina D. Si el analito epimérico de vitamina D está presente, menor es el número de moléculas de reactivo compuesto de partículas que se acercan al reactivo quimioluminiscente. Por lo tanto, habrá una disminución en la señal de ensayo. El fotosensibilizador genera oxígeno singlete y activa el reactivo quimioluminiscente cuando los dos marcadores están en proximidad cercana. El reactivo quimioluminiscente activado



produce subsecuentemente luz. La cantidad de luz producida se relaciona con la cantidad del complejo formado, que a su vez se relaciona con la cantidad de analito epimérico de vitamina D presente en la muestra.

5 En otro ejemplo particular de un inmunoensayo de luminiscencia inducida, el ensayo utiliza una partícula que tiene asociada con el mismo un compuesto quimioluminiscente en el que un análogo de la vitamina D se une a la partícula (reactivo compuesto de partículas). El reactivo fotosensibilizador comprende un anticuerpo para el analito epimérico de vitamina D. El analito epimérico de vitamina D compete con el reactivo compuesto de partículas para unirse al anticuerpo para el analito epimérico de vitamina D. Si el analito epimérico de vitamina D está presente, menor es el número de moléculas de reactivo compuesto de partículas que se acercan al reactivo fotosensibilizador. Por lo tanto, habrá una disminución en la señal de ensayo. El fotosensibilizador genera oxígeno singlete y activa el compuesto quimioluminiscente del reactivo compuesto de partículas cuando los dos marcadores están en proximidad cercana. El compuesto quimioluminiscente activado produce posteriormente luz. La cantidad de luz producida se relaciona con la cantidad del complejo formado, que a su vez se relaciona con la cantidad de analito epimérico de vitamina D presente en la muestra.

15 En otro ejemplo particular de un ensayo de luminiscencia inducida, se emplea una partícula fotosensibilizadora que se conjuga con un asociado de unión para una molécula pequeña tal como, por ejemplo, avidina o estreptavidina (que son asociados de unión para la biotina). También se emplea un análogo de la vitamina D que comprende biotina (reactivo compuesto de biotina). Como parte del sistema de detección se emplea un reactivo quimioluminiscente que comprende un anticuerpo para el analito epimérico de vitamina D. El medio de reacción se incubaba para permitir que la avidina o la estreptavidina de las partículas fotosensibilizadoras se unan al reactivo compuesto de biotina en virtud de la unión entre la avidina y la biotina y también para permitir que el anticuerpo para el analito epimérico de vitamina D que forma parte del reactivo quimioluminiscente se una al analito epimérico de vitamina D o al análogo de vitamina D que ahora está unido a las partículas fotosensibilizadoras. Luego, el medio se irradia con luz para excitar el fotosensibilizador, que es capaz en su estado excitado de activar el oxígeno a un estado singlete. Debido a que menos reactivo quimioluminiscente está ahora cerca del fotosensibilizador debido a la presencia del analito epimérico de vitamina D, hay menos activación del reactivo quimioluminiscente por el oxígeno singlete y menos luminiscencia. Luego se examina el medio para determinar la presencia y/o la cantidad de luminiscencia o luz emitida, estando su presencia relacionada con la presencia y/o la cantidad del analito epimérico de vitamina D, donde se observa una disminución de la señal en presencia del analito epimérico de vitamina D.

30 En otro ejemplo particular de un ensayo de luminiscencia inducida, se emplea una partícula fotosensibilizadora que se conjuga con un asociado de unión para una molécula pequeña tal como, por ejemplo, avidina o estreptavidina (que son asociados de unión para la biotina). Un reactivo conjugado comprende un anticuerpo para el analito epimérico de vitamina D conjugado con biotina. También se emplea un análogo de vitamina D cuando el compuesto está unido a una partícula quimioluminiscente (reactivo compuesto quimioluminiscente). El medio de reacción se incubaba para permitir que la avidina o la estreptavidina de las partículas fotosensibilizadoras se unan al reactivo anticuerpo-biotina en virtud de la unión entre la avidina y la biotina y también para permitir que el anticuerpo para que el analito de la vitamina D se unan al analito epimérico de vitamina D si está presente en la muestra y al análogo de vitamina D que es parte del reactivo de compuesto quimioluminiscente. Luego, el medio se irradia con luz para excitar el fotosensibilizador, que es capaz en su estado excitado de activar el oxígeno a un estado singlete. Debido a que menos reactivo de compuesto quimioluminiscente está ahora cerca del fotosensibilizador debido a la presencia del analito epimérico de vitamina D, hay menos activación del reactivo quimioluminiscente por el oxígeno singlete y menos luminiscencia. Luego se examina el medio para determinar la presencia y/o la cantidad de luminiscencia o luz emitida, y su presencia está relacionada con la presencia y/o la cantidad del analito epimérico de vitamina D, donde se observa una disminución de la señal en presencia del analito epimérico de vitamina D.

45 Otro ejemplo, a modo de ilustración y no de limitación, de un formato de ensayo para la detección de un analito epimérico de vitamina D es el formato de ensayo ACMIA. Para el formato de ensayo ACMIA, las partículas de cromo, que están recubiertas con un análogo de vitamina D (reactivo de partículas de cromo), se emplean como primer componente. Un segundo componente es un anticuerpo para el analito epimérico de vitamina D. Este anticuerpo, entrecruzado a una enzima informadora (por ejemplo,  $\beta$ -galactosidasa) para formar un conjugado anticuerpo-enzima, se agrega a un recipiente de reacción en una cantidad en exceso, es decir, una cantidad mayor que la requerida para unir todo el analito epimérico de vitamina D que podría estar presente en una muestra. Una muestra, que se somete previamente a un tratamiento con un agente de liberación, se trata con un anticuerpo para el analito epimérico de vitamina D, que se une al analito epimérico de vitamina D en la muestra. El conjugado anticuerpo-enzima se mezcla con la muestra en el medio para permitir que el analito epimérico de vitamina D se una al anticuerpo. A continuación, se agrega el reactivo de partículas de cromo para unir cualquier exceso de conjugado anticuerpo-enzima. Luego, se aplica un imán, que extrae de la suspensión todas las partículas de cromo y el exceso de enzima-anticuerpo, y el sobrenadante se transfiere a un recipiente de reacción final. El sustrato de la enzima informadora se agrega al recipiente de reacción final, y la actividad enzimática se mide espectrofotométricamente como un cambio en la absorbancia a lo largo del tiempo. La cantidad de esta señal está relacionada con la cantidad del analito epimérico de vitamina D en la muestra.

60 Otro ejemplo de un ensayo para el analito epimérico de vitamina D de acuerdo con los principios descritos en el presente documento es un inmunoensayo marcado con éster de acridinio que utiliza partículas paramagnéticas como fase sólida (inmunoensayo ADVIA). El sistema de detección empleado para este ejemplo de un ensayo para epímeros

de un analito de vitamina D incluye un análogo de la vitamina D marcado con una molécula pequeña (unidad estructural de captura) como un conjugado de molécula pequeña o conjugado de captura, asociado de unión para las partículas de látex paramagnético recubiertas de molécula pequeña como una fase sólida (SP), y un anticuerpo marcado con éster de acridinio para el analito epimérico de vitamina D (anticuerpo de detección). La molécula pequeña puede ser, por ejemplo, biotina o fluoresceína y el asociado de unión respectivo puede ser estreptavidina o anticuerpo para la fluoresceína. El análogo de la vitamina D se puede enlazar a la molécula pequeña directamente o a través de un grupo de enlace tal como, por ejemplo, una proteína, por ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA). El analito epimérico de vitamina D en una muestra de un paciente compete con el análogo de vitamina D de la unidad estructural de captura por la unión al anticuerpo anti-epimérico de detección de vitamina D marcado con éster de acridinio. La muestra sospechosa de contener analito epimérico de vitamina D se somete a un tratamiento previo con 1,8-ANS. El ensayo se puede llevar a cabo en un aparato Centaur®, Centaur® XP o Centaur® CP (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark DE) de acuerdo con las instrucciones del fabricante suministradas con el mismo. La cantidad de esta señal está relacionada con la cantidad del analito epimérico de vitamina D en la muestra.

Otro ejemplo de un ensayo para un analito epimérico de vitamina D de acuerdo con los principios descritos en este documento es un inmunoensayo marcado con éster de acridinio que usa partículas paramagnéticas como fase sólida (inmunoensayo ADVIA). El sistema de detección empleado para este ejemplo de un ensayo para un epímero de un analito de vitamina D incluye un anticuerpo marcado con una molécula pequeña para el analito epimérico de vitamina D (anticuerpo de captura) como el conjugado de biotina o el conjugado de captura, partículas de látex paramagnéticas recubiertas con estreptavidina como una fase sólida (SP) y un análogo de vitamina D marcado con éster de acridinio (detección de hapteno). El marcador de éster de acridinio se puede unir directamente al análogo de la vitamina D para formar el hapteno de detección o se puede emplear un grupo de enlace que incluya, por ejemplo, una proteína tal como, por ejemplo, BSA. El analito epimérico de vitamina D en una muestra de un paciente compete con el hapteno de detección marcado con éster de acridinio por la unión con el anticuerpo para el analito epimérico de vitamina D. La muestra sospechosa de contener analito epimérico de vitamina D se somete a un tratamiento previo con 1,8-ANS. El ensayo se puede llevar a cabo en un aparato Centaur®, Centaur® XP o Centaur® CP (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark DE) de acuerdo con las instrucciones del fabricante suministradas con el mismo. En variaciones de los anteriores ensayos de éster de acridinio, la molécula pequeña puede ser, por ejemplo, biotina o fluoresceína. La cantidad de esta señal está relacionada con la cantidad del analito D epimérico en la muestra.

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

Las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo generalmente se determinarán por el rango de concentración de interés del analito epimérico de vitamina D y la naturaleza del ensayo, por ejemplo. Sin embargo, la concentración final de cada uno de los reactivos normalmente se determina empíricamente para optimizar la sensibilidad del ensayo sobre el rango de interés. Es decir, una variación en la concentración de analito epimérico de vitamina D que sea importante debe proporcionar una diferencia de señal medible con precisión. Consideraciones tales como la naturaleza del sistema que produce la señal y la naturaleza de los analitos normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

Como se mencionó anteriormente, la muestra y los reactivos se proporcionan en combinación en el medio. Si bien el orden de adición al medio puede variar, habrá ciertas preferencias para algunas realizaciones de los formatos de ensayo descritos en este documento. El orden de adición más simple, por supuesto, es agregar todos los materiales simultáneamente y determinar el efecto que el medio de ensayo tiene sobre la señal como en un ensayo homogéneo. Alternativamente, cada uno de los reactivos, o grupos de reactivos, se pueden combinar secuencialmente. En algunas realizaciones, una etapa de incubación puede estar implicada subsecuente a cada adición como se discutió anteriormente. En ensayos heterogéneos, las etapas de lavado también pueden emplearse después de una o más etapas de incubación.

Ejemplos específicos de ensayos para los epímeros de vitamina D que emplean reactivos de acuerdo con los principios descritos aquí

Como se mencionó anteriormente, un ejemplo particular de acuerdo con los principios descritos aquí está dirigido a los métodos para determinar uno o ambos de la presencia y la cantidad de epímeros de vitamina D (como se definió anteriormente) en una muestra sospechosa de contener epímeros de vitamina D. Cualquiera de los formatos de ensayo anteriores puede emplearse usando un anticuerpo generado contra un inmunógeno que es un compuesto de la Fórmula I en la que Z es un portador inmunogénico. En algunos ejemplos, el inmunógeno es un compuesto de la Fórmula IIa (véase Fig. 3). En algunos ejemplos, el inmunógeno es un compuesto de la Fórmula IIb (véase Fig. 5). En algunos ejemplos, el anticuerpo empleado es el anticuerpo 4G8 o el anticuerpo 8F10. Los anticuerpos producidos a partir de otros inmunógenos consistentes con los principios descritos en el presente documento pueden emplearse en cualquiera de los formatos de ensayo anteriores.

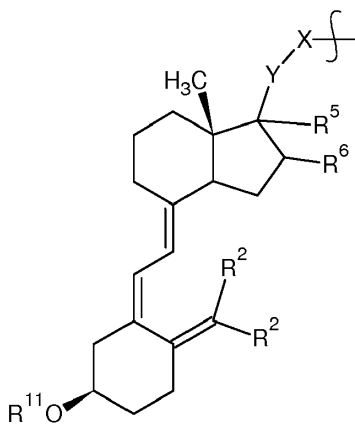
- Un ejemplo de un ensayo para un epímero de un analito de vitamina D es un ensayo de luminiscencia inducida para la detección de 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>3</sub> en una muestra que se sospecha que contiene 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>3</sub>. La muestra se trata con un agente de liberación para liberar 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>3</sub> de unidades estructurales de unión endógenas. Luego, la muestra se combina con un reactivo que comprende el anticuerpo 4G8.2 o el anticuerpo 8F10.2, que es un anticuerpo para 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>3</sub>, conjugado con biotina (reactivo de anticuerpo-biotina) en un medio de reacción, que se incuba para permitir la unión entre el reactivo de anticuerpo-biotina y el analito 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>3</sub>. Luego, se agrega un reactivo quimioluminiscente donde el reactivo comprende un análogo de vitamina D, cuyo ejemplo es un compuesto de Fórmula IIa unido a una partícula quimioluminiscente. El reactivo quimioluminiscente se une al exceso de reactivo anticuerpo-biotina, es decir, el reactivo anticuerpo-biotina que no se une al analito 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>3</sub> en la muestra. Luego, se agrega un reactivo de partículas fotosensibilizador que se conjuga con una estreptavidina. El medio de reacción se incuba para permitir que la estreptavidina de las partículas fotosensibilizadoras se una al reactivo anticuerpo-biotina en virtud de la unión entre la estreptavidina y la biotina. Luego, el medio se irradia con luz para excitar el fotosensibilizador, que es capaz en su estado excitado de activar el oxígeno a un estado singlete. Debido a que menos reactivo quimioluminiscente está ahora cerca del fotosensibilizador debido a la presencia del analito 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>3</sub>, hay menos activación del reactivo quimioluminiscente por el oxígeno singlete y menos luminiscencia. Luego se examina el medio para determinar la presencia y/o la cantidad de luminiscencia o luz emitida, estando su presencia relacionada con la presencia y/o la cantidad del analito 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>3</sub>, donde se observa una disminución de la señal en la presencia del analito 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>3</sub>.
- Los ensayos para los analitos de la vitamina D se pueden llevar a cabo utilizando un compuesto de la Fórmula I en donde Z es un marcador de poli(aminoácido), o un marcador de no poli(aminoácido) o un soporte.

#### Compuestos

Como se mencionó anteriormente, algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos aquí están dirigidos a anticuerpos generados contra compuestos de la Fórmula I:



en donde R<sup>1</sup> =



o H, en donde al menos uno de R<sup>1</sup> no es H,

Y es O, S, CR, o NR<sup>4</sup>,

- X es -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>-C(O)-, o -NR<sup>3</sup>-C(O)-; en algunos ejemplos, X es -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(O)- cuando Y es NR<sup>4</sup>, por ejemplo, -(CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>-C(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-C(O)-, o -(CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>-C(O)-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-C(O)- cuando Y es O o S, por ejemplo, o -NR<sup>3</sup>-C(O)- cuando Y es CR, por ejemplo,

R es independientemente H o alquilo,

R<sup>2</sup> es independientemente H o alquilo,

- R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son independientemente H o alquilo, o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se pueden tomar juntos para formar un enlace, o R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> se pueden tomar juntos para formar un enlace,

R<sup>11</sup> es H, alquilo, o acilo,

n es un entero de 1 a 10, o 1 a 9, o 1 a 8, o 1 a 7, o 1 a 6, o 1 a 5, o 1 a 4, o 1 a 3, o 1 a 2, o 2 a 10, o 2 a 9, o 2 a 8, o 2 a 7, o 2 a 6, o 2 a 5, o 2 a 4, o 2 a 3, o 3 a 10, o 3 a 9, o 3 a 8, o 3 a 7, o 3 a 6, o 3 a 5, o 3 a 4, o 4 a 10, o 4 a 9,

## ES 2 731 254 T3

o 4 a 8, o 4 a 7, o 4 a 6, o 4 a 5, o 5 a 10, o 5 a 9, o 5 a 8, o 5 a 7, o 5 a 6, o 6 a 10, o 6 a 9, o 6 a 8, o 6 a 7, o 7 a 10, o 7 a 9, o 7 a 8, o 8 a 10, o 8 a 9, o 9 a 10, por ejemplo,

5 w es un entero de 0 a 10, 1 a 10, o 1 a 9, o 1 a 8, o 1 a 7, o 1 a 6, o 1 a 5, o 1 a 4, o 1 a 3, o 1 a 2, o 2 a 10, o 2 a 9, o 2 a 8, o 2 a 7, o 2 a 6, o 2 a 5, o 2 a 4, o 2 a 3, o 3 a 10, o 3 a 9, o 3 a 8, o 3 a 7, o 3 a 6, o 3 a 5, o 3 a 4, o 4 a 10, o 4 a 9, o 4 a 8, o 4 a 7, o 4 a 6, o 4 a 5, o 5 a 10, o 5 a 9, o 5 a 8, o 5 a 7, o 5 a 6, o 6 a 10, o 6 a 9, o 6 a 8, o 6 a 7, o 7 a 10, o 7 a 9, o 7 a 8, o 8 a 10, o 8 a 9, o 9 a 10, por ejemplo,

10 x es un entero de 1 a 10, o 1 a 9, o 1 a 8, o 1 a 7, o 1 a 6, o 1 a 5, o 1 a 4, o 1 a 3, o 1 a 2, o 2 a 10, o 2 a 9, o 2 a 8, o 2 a 7, o 2 a 6, o 2 a 5, o 2 a 4, o 2 a 3, o 3 a 10, o 3 a 9, o 3 a 8, o 3 a 7, o 3 a 6, o 3 a 5, o 3 a 4, o 4 a 10, o 4 a 9, o 4 a 8, o 4 a 7, o 4 a 6, o 4 a 5, o 5 a 10, o 5 a 9, o 5 a 8, o 5 a 7, o 5 a 6, o 6 a 10, o 6 a 9, o 6 a 8, o 6 a 7, o 7 a 10, o 7 a 9, o 7 a 8, o 8 a 10, o 8 a 9, o 9 a 10, por ejemplo,

y es un entero de 1 a 10, o 1 a 9, o 1 a 8, o 1 a 7, o 1 a 6, o 1 a 5, o 1 a 4, o 1 a 3, o 1 a 2, o 2 a 10, o 2 a 9, o 2 a 8, o 2 a 7, o 2 a 6, o 2 a 5, o 2 a 4, o 2 a 3, o 3 a 10, o 3 a 9, o 3 a 8, o 3 a 7, o 3 a 6, o 3 a 5, o 3 a 4, o 4 a 10, o 4 a 9, o 4 a 8, o 4 a 7, o 4 a 6, o 4 a 5, o 5 a 10, o 5 a 9, o 5 a 8, o 5 a 7, o 5 a 6, o 6 a 10, o 6 a 9, o 6 a 8, o 6 a 7, o 7 a 10, o 7 a 9, o 7 a 8, o 8 a 10, o 8 a 9, o 9 a 10, por ejemplo,

15 p es un entero de 1 a 10, o 1 a 9, o 1 a 8, o 1 a 7, o 1 a 6, o 1 a 5, o 1 a 4, o 1 a 3, o 1 a 2, o 2 a 10, o 2 a 9, o 2 a 8, o 2 a 7, o 2 a 6, o 2 a 5, o 2 a 4, o 2 a 3, o 3 a 10, o 3 a 9, o 3 a 8, o 3 a 7, o 3 a 6, o 3 a 5, o 3 a 4, o 4 a 10, o 4 a 9, o 4 a 8, o 4 a 7, o 4 a 6, o 4 a 5, o 5 a 10, o 5 a 9, o 5 a 8, o 5 a 7, o 5 a 6, o 6 a 10, o 6 a 9, o 6 a 8, o 6 a 7, o 7 a 10, o 7 a 9, o 7 a 8, o 8 a 10, o 8 a 9, o 9 a 10, por ejemplo,

L es un grupo enlazante,

20 q es 0 o 1, y

Z es OR8 en donde R8 es H, alquilo, o NR9R10 en donde R9 y R10 son independientemente H o alquilo, una unidad estructural de portador inmunogénico de poli(aminoácido), una unidad estructural de portador inmunogénico no poli(aminoácido), una unidad estructural de marcador de poli(aminoácido), una unidad estructural de marcador no poli(aminoácido), una unidad estructural de poli(aminoácido) no marcado, una unidad estructural de poli(aminoácido) portador no inmunogénico, o un soporte; e incluyendo mezclas de dos o más de los compuestos anteriores.

30 Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" incluye aquellos grupos alquilo de un número designado de átomos de carbono de bien sea una configuración lineal, ramificada o cíclica. Ejemplos de "alquilo" incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec y tert-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, norbornilo, por ejemplo. En algunos ejemplos, el alquilo contiene 1 a 10, o 1 a 9, o 1 a 8, o 1 a 7, o 1 a 6, o 1 a 5, o 1 a 4, o 1 a 3, o 1 a 2, o 2 a 10, o 2 a 9, o 2 a 8, o 2 a 7, o 2 a 6, o 2 a 5, o 2 a 4, o 2 a 3, o 3 a 10, o 3 a 9, o 3 a 8, o 3 a 7, o 3 a 6, o 3 a 5, o 3 a 4, o 4 a 10, o 4 a 9, o 4 a 8, o 4 a 7, o 4 a 6, o 4 a 5, o 5 a 10, o 5 a 9, o 5 a 8, o 5 a 7, o 5 a 6, o 6 a 10, o 6 a 9, o 6 a 8, o 6 a 7, o 7 a 10, o 7 a 9, o 7 a 8, o 8 a 10, o 8 a 9, o 9 a 10, átomos de carbono, que pueden estar sin sustituir o uno o más de los cuales pueden estar sustituidos con uno o más de hidroxilo, alcoxi de 1 a 5, o 1 a 4, de 1 a 3, o 1 a 2, o 2 a 5, o 2 a 4, o 2 a 3, o 3 a 5, o 3 a 4, o 4 a 5 átomos de carbono.

35 Como se usa en el presente documento, el término "acilo" significa  $R^{12}C(O)$ - donde  $R^{12}$  es alquilo o arilo.

Como se usa en este documento, el término "arilo" significa un radical orgánico derivado de un hidrocarburo aromático mediante la eliminación de un átomo y que contiene uno o más anillos aromáticos, usualmente de uno a cuatro anillos aromáticos, tal como, por ejemplo, fenilo (de benceno), naftilo (de naftaleno), etc., por ejemplo, fenilo, naftilo, fenantrilo.

40 Como se usa en este documento, la expresión "grupo de enlace" se refiere a una unidad estructural química que puede comprender de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 átomos, o de 4 a aproximadamente 30 átomos, sin contar el hidrógeno y puede comprender una cadena de 2 a aproximadamente 30 átomos, o 3 a aproximadamente 20 átomos, cada uno seleccionado independientemente del grupo que normalmente consiste en carbono, oxígeno, azufre, nitrógeno y fósforo. En algunos ejemplos, parte o la totalidad del grupo de enlace puede ser una porción de la molécula que está enlazada, como por ejemplo, un residuo de aminoácido en un poli(aminoácido), por ejemplo. El número de heteroátomos en el grupo de enlace puede estar en el rango de 0 a aproximadamente 20, o de 1 a aproximadamente 15, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 10. El grupo de enlace puede ser alifático o aromático. Cuando hay heteroátomos, el oxígeno normalmente está presente como oxo u oxi, unido al carbono, azufre, nitrógeno o fósforo, el nitrógeno normalmente está presente como nitro, nitroso o amino, normalmente unido al carbono, oxígeno, azufre o fósforo; El azufre es análogo al oxígeno; mientras que el fósforo está unido al carbono, azufre, oxígeno o nitrógeno, usualmente como fosfonato y fosfato mono o diéster. Las funcionalidades comunes en la formación de un enlace covalente entre el grupo de enlace y la molécula a conjugar son alquilamina, amidina, tioamida, éter, urea, tiourea, guanidina, azo, tioéter y carboxilato, sulfonato y ésteres de fosfato, amidas y tioésteres.

55 En su mayor parte, cuando un grupo de enlace tiene una funcionalidad de enlace (funcionalidad para la reacción con una unidad estructural) tal como, por ejemplo, un grupo no oxocarbonilo que incluye análogos de nitrógeno y azufre, un grupo fosfato, un grupo amino, un agente alquilante tal como halo o tosilaalquilo, oxi (hidroxilo o análogo de azufre,

5 mercapto) oxocarbonilo (por ejemplo, aldehído o cetona), o una olefina activa tal como una vinil sulfona o un éster  $\alpha$ -,  $\beta$ -insaturado, estas funcionalidades están enlazadas a grupos amina, grupos carboxilo, olefinas activas, agentes alquilantes, por ejemplo, bromoacetilo. Cuando se enlazan una amina y un ácido carboxílico o su derivado de nitrógeno o ácido fosfórico, se forman amidas, amidinas y fosforamidas. Cuando se enlazan mercaptano y olefina activada, se forman tioéteres. Cuando se enlazan un mercaptano y un agente alquilante, se forman tioéteres. Cuando el aldehído y una amina se enlazan bajo condiciones reductoras, se forma una alquilamina. Cuando una cetona o un aldehído y una hidroxilamina (incluidos los derivados de la misma donde un sustituyente está en lugar del hidrógeno del grupo hidroxilo) están enlazados, se forma una funcionalidad oxima (=N-O-). Cuando se enlazan un ácido carboxílico o un ácido fosfato y un alcohol, se forman ésteres.

10 Como se usa en el presente documento, el término "portador inmunogénico" significa un grupo o unidad estructural que está conjugada a un hapteno. El conjugado del portador inmunogénico y el hapteno se pueden inyectar en un organismo capaz de provocar una respuesta inmunitaria tal como, por ejemplo, un mamífero, un ave (por ejemplo, pollo o paloma), un anfibio o un reptil; o el conjugado se puede usar para inocular una muestra in vitro (mamíferos, incluyendo humanos, aves, anfibios o reptiles) o de otra manera se puede emplear en una técnica para producir un asociado de unión para el hapteno.

15 La expresión "asociado de unión" se refiere a una molécula que es un miembro de un par de unión específico, que es una de las dos moléculas diferentes que se une específicamente a y, por lo tanto, se define como complementaria con la otra molécula. Por ejemplo, un miembro del par de unión específico puede tener un área en la superficie o en una cavidad que se une específicamente a una organización espacial y polar particular del otro miembro del par de unión específico. El asociado de unión puede ser, a título ilustrativo y no limitativo, un anticuerpo o un aptámero (por ejemplo, aptámero de ácido nucleico o aptámero peptídico), por ejemplo. En un ejemplo, se puede emplear un portador inmunogénico como un inmunógeno para inducir una respuesta inmune y provocar la producción de un asociado de unión para un hapteno. Otras técnicas incluyen la presentación de fagos y la selección in vitro. Los portadores inmunogénicos también se denominan a veces portadores antigénicos. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, los inmunógenos que comprenden portadores inmunogénicos, que incluyen portadores inmunogénicos de poli(aminoácido) y no poli(aminoácido), se sintetizan y se usan para preparar anticuerpos. Los haptenos son compuestos capaces de unirse específicamente a los anticuerpos correspondientes, pero no actúan ellos mismos como inmunógenos (o antígenos) para la preparación de los anticuerpos. En consecuencia, un hapteno está enlazado a un portador inmunogénico, que puede emplearse, por ejemplo, para producir anticuerpos.

20 El rango de peso molecular (en Daltons) para los poli(aminoácidos) que son portadores inmunogénicos es de aproximadamente 5,000 a aproximadamente 10,000,000, o de aproximadamente 20,000 a aproximadamente 600,000, o de aproximadamente 25,000 a aproximadamente 250,000, por ejemplo. Las "unidades estructurales de portadores inmunogénicos de poli(aminoácidos)" incluyen proteínas tales como, por ejemplo, albúminas, proteínas séricas, por ejemplo, globulinas, proteínas de lentes oculares y lipoproteínas. Las proteínas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, albúmina de suero bovino (BSA), hemocianina de lapa californiana (KLH), ovoalbúmina de huevo y gamma-globulina bovina (BGG), por ejemplo. Las "unidades estructurales de portadores inmunogénicos no poli(aminoácidos)" incluyen polisacáridos, ácidos nucleicos y partículas (materiales biológicos y sintéticos). Una amplia variedad de portadores inmunogénicos se describe en Davalian, et al., Patente U.S. Nº 5,089,390, columna 4, línea 57 a columna 5, línea 5.

35 Como se mencionó anteriormente, La unidad estructural de portador inmunogénico puede ser un polisacárido, que es un polímero de alto peso molecular de monosacáridos que se puede preparar de forma natural o sintética y usualmente implica condensaciones repetidas de monosacáridos. Ejemplos de polisacáridos son almidones, glucógeno, celulosa, gomas de carbohidratos, tales como goma arábiga, agar, y así sucesivamente. El polisacárido también puede contener residuos de poli(aminoácidos) y/o residuos lipídicos.

40 Como se usa en el presente documento, el término "marcador" incluye marcadores de poli(aminoácido) y marcadores de no poli(aminoácido). El término "unidades estructurales de marcador de poli(aminoácido)" incluye marcadores que son proteínas tales como, pero sin limitarse a, enzimas, anticuerpos, péptidos e inmunógenos, por ejemplo. Con proteínas marcadoras tales como, por ejemplo, enzimas, el rango de peso molecular promedio en peso será de aproximadamente 10,000 a aproximadamente 600,000 o de aproximadamente 10,000 a aproximadamente 300,000. Usualmente, hay al menos un compuesto de acuerdo con los principios descritos aquí (grupo análogo) por aproximadamente 200,000 de peso molecular, o al menos aproximadamente 1 por aproximadamente 150,000 de peso molecular, o al menos aproximadamente 1 por aproximadamente 100,000 de peso molecular, o al menos aproximadamente 1 por aproximadamente 50,000 de peso molecular, o al menos aproximadamente 1 por 40,000, peso molecular, o al menos aproximadamente 1 por 30,000 de peso molecular, o al menos 1 por 20,000 de peso molecular, o al menos uno por 10,000 de peso molecular, o al menos uno por 5,000 de peso moleculares, por ejemplo, de la proteína. En el caso de las enzimas, el número de grupos análogos suele ser de 1 a aproximadamente 20, aproximadamente 2 a aproximadamente 15, aproximadamente 3 a aproximadamente 12, o aproximadamente 6 a aproximadamente 10.

60 Las enzimas incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, enzimas redox tales como, por ejemplo, deshidrogenasas, por ejemplo, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y lactato deshidrogenasa; enzimas que implican la producción de peróxido de hidrógeno y el uso del peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de

colorante a un colorante tal como, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, lactoperoxidasa y microperoxidasa; hidrolasas tales como, por ejemplo, fosfatasa alcalina y  $\beta$ -galactosidasa; luciferasas tales como, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; transferasas; combinaciones de enzimas tales como, pero no limitadas a, sacaridas oxidasas, por ejemplo, glucosa y galactosa oxidasas, u oxidasas heterocíclicas, tales como uricasa y xantina oxidasas, acoplada con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante, que es peroxidasa tal como la peroxidasa de rábano picante, lactoperoxidasa o microperoxidasa, por ejemplo.

Como se usa en el presente documento, el término "marcadores de no poli(aminoácido)" incluye aquellos marcadores que no son proteínas. El marcador de no poli(aminoácido) se puede detectar directamente o es detectable a través de una reacción que produce una señal detectable. El marcador no poli(aminoácido) puede ser isotópico o no isotópico y puede ser, a título ilustrativo y no limitativo, un radioisótopo, un compuesto luminiscente (que incluye, pero no se limita a, compuestos fluorescentes y compuestos quimioluminiscentes por ejemplo), un polinucleótido que codifica un catalizador, un promotor, un colorante, una coenzima, un sustrato enzimático, un grupo radioactivo, una molécula orgánica pequeña (peso molecular de 200 a 2,000), una partícula y una secuencia de polinucleótidos amplificable, por ejemplo.

Como se mencionó anteriormente, una "molécula orgánica pequeña" tiene un peso molecular de aproximadamente 200 a aproximadamente 2,000, o aproximadamente 200 a aproximadamente 1,500, o aproximadamente 200 a aproximadamente 1,000, o aproximadamente 200 a aproximadamente 500. Tales "moléculas orgánicas pequeñas" incluyen, pero no se limitan a, biotina, moléculas fluorescentes (tales como la fluoresceína y rodamina, por ejemplo), moléculas quimioluminiscentes y dinitrofenol, por ejemplo. Un asociado de unión para una molécula orgánica pequeña es una molécula que reconoce específicamente y se une a la molécula pequeña. Los asociados de unión para una molécula pequeña se definen por la naturaleza de la molécula pequeña e incluyen, pero no se limitan a, avidina, estreptavidina, anticuerpo para la molécula orgánica pequeña (que incluye, pero no se limita a, anticuerpo para una molécula fluorescente (tal como el anticuerpo para la fluoresceína y el anticuerpo para la rodamina, por ejemplo), el anticuerpo para una molécula quimioluminiscente y el anticuerpo para el dinitrofenol, por ejemplo.

Como se usa en el presente documento, los términos "unidad estructural de poli(aminoácido) no marcado" y "unidad estructural de poli(aminoácido) portador no inmunogénico" se refieren a poli(aminoácidos) que normalmente no se consideran marcadores o portadores inmunogénicos, aunque tales unidades estructurales pueden ser marcadores o portadores inmunogénicos en determinadas circunstancias. Por ejemplo, un anticuerpo puede no considerarse un marcador, pero puede ser un marcador si el anticuerpo se modifica para incluir una unidad estructural que produce una señal o parte de un sistema que produce una señal. Adicionalmente, un anticuerpo no puede considerarse un portador inmunogénico, pero, sin embargo, es capaz de ser un portador inmunogénico en ciertas circunstancias debido a su mayor peso molecular.

En algunos ejemplos, el marcador no poli(aminoácido) puede seleccionarse del grupo que consiste en soportes, partículas magnéticas, ésteres de acridinio, una combinación de partículas magnéticas y ésteres de acridinio (tal como, por ejemplo, partículas paramagnéticas marcadas con éster de acridinio), Partículas quimioluminiscentes y partículas sensibilizadoras.

El término "covalente" se refiere a la unión de moléculas, tal como por una conexión directa, por ejemplo, un enlace químico entre las moléculas. El término "no covalente" se refiere a la unión de moléculas que involucran la unión específica entre miembros de par de unión específica complementaria (sbp) que están unidas a las moléculas.

En algunos ejemplos, los compuestos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento pueden asociarse con un soporte, por ejemplo, mediante unión covalente o no covalente. Como se mencionó anteriormente, en algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos aquí,  $R^2$  puede ser un soporte, que puede comprender un material orgánico o inorgánico, sólido o fluido, insoluble en agua y que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte puede tener cualquiera de una serie de formas, tales como, pero no limitadas a, una partícula (soporte en partículas) que incluye una perla, una película, una membrana, un tubo, un pozo, una tira, una barra, una fibra o una superficie plana tal como, por ejemplo, una placa o papel, por ejemplo. El soporte puede o puede no ser suspendible en el medio en el que se emplea. Ejemplos de soportes suspendibles son materiales poliméricos tales como látex, bicapas lipídicas o liposomas, gotitas de aceite, células e hidrogeles, y partículas magnéticas, por ejemplo. Otras composiciones de soporte incluyen polímeros, tales como, a modo de ilustración y no de limitación, nitrocelulosa, acetato de celulosa, poli(cloruro de vinilo), poli(acrilamida), poli(acrilato), polietileno, polipropileno, poli(4 metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno) ), nailon, poli(butirato de vinilo), por ejemplo, bien sea usado solo o junto con otros materiales. El soporte puede o puede no estar marcado adicionalmente con un colorante, catalizador u otro grupo detectable, por ejemplo.

En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, el soporte puede ser una partícula. Las partículas tienen un diámetro promedio de al menos aproximadamente 0.02 micrones y no más de aproximadamente 100 micrones. En algunos ejemplos, las partículas tienen un diámetro promedio de aproximadamente 0.05 micrones a aproximadamente 20 micrones, o de aproximadamente 0.3 micrones a aproximadamente 10 micrones. La partícula puede ser orgánica o inorgánica, hinchable o no hinchable, porosa o no porosa, preferiblemente de una densidad de agua aproximada, generalmente de aproximadamente 0.7 g/ml a aproximadamente 1.5 g/ml, y compuesta de material que puede ser transparente, parcialmente transparente, u opaco.

5 Las partículas pueden ser materiales biológicos tales como células y microorganismos, por ejemplo, eritrocitos, leucocitos, linfocitos, hibridomas, estreptococos, Staphylococcus aureus y virus de E. coli, por ejemplo. Las partículas también pueden ser partículas compuestas de polímeros orgánicos e inorgánicos, liposomas, partículas de látex, partículas magnéticas o no magnéticas, vesículas de fosfolípidos, quilomicrones, lipoproteínas y similares. En algunos ejemplos, las partículas son partículas de dióxido de cromo (cromo) o partículas de látex.

Las partículas magnéticas incluyen partículas paramagnéticas, partículas ferromagnéticas y partículas diamagnéticas. Tales partículas incluyen, pero no se limitan a, metales de transición de los períodos 4 a 7 de la Tabla Periódica que incluyen cromo, cobre, cobalto, aluminio, manganeso, hierro y níquel, por ejemplo.

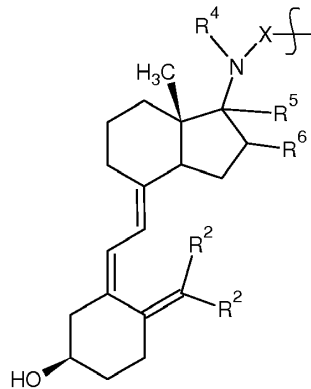
10 Las partículas quimioluminiscentes son partículas que tienen asociadas con la misma un compuesto quimioluminiscente. La expresión "asociado con el mismo" como se usa en este documento significa que un compuesto tal como, por ejemplo, un compuesto quimioluminiscente y una partícula pueden estar asociados por enlace directo o indirecto, adsorción, absorción, incorporación o solución, por ejemplo. Ejemplos de compuestos quimioluminiscentes que pueden utilizarse son los que se exponen en las patentes U.S. números 5,340,716 y 6,251,581. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, el compuesto quimioluminiscente es una sustancia fotoactivable que experimenta una reacción química por excitación directa o sensibilizada por la luz o por reacción con oxígeno singlete para formar un producto de reacción metaestable que es capaz de descomponerse con la reacción simultánea o subsecuente emisión de luz, usualmente dentro del rango de longitud de onda de 250 a 1200 nm. El término "fotoactivable" incluye "fotoquímicamente activable". En algunos ejemplos, los compuestos quimioluminiscentes son aquellos que reaccionan con el oxígeno singlete para formar dioxetanos o dioxetanonas. Las últimas usualmente son olefinas ricas en electrones. Ejemplos de tales olefinas ricas en electrones son éteres de enol, enaminas, 9-alkilideno-N-alkilacridanos, arilviniléteres, dioxenos, arilimidazoles, 9-alkilideno-xantanos y lucigenina. Otros compuestos incluyen luminol y otras ftalhidracidas y compuestos quimioluminiscentes que están protegidos de sufrir una reacción quimioluminiscente en virtud de su protección por un grupo protector fotoquímicamente lábil, tales compuestos incluyen, por ejemplo, luciferina de luciérnaga, acuaforina y luminol. Ejemplos de tales compuestos quimioluminiscentes que pueden utilizarse son los que se exponen en la patente U.S. No. 5,709,994.

Las partículas sensibilizadoras son partículas que tienen asociadas un compuesto sensibilizador, que incluye, pero no se limita a, un compuesto fotosensibilizador. Ejemplos de compuestos sensibilizadores que pueden utilizarse son los que se exponen en las patentes U.S. números 5,340,716 y 6,251,581.

30 Un fotosensibilizador es un sensibilizador para la generación de oxígeno singlete, usualmente por excitación con luz. En algunos ejemplos, el fotosensibilizador absorbe a una longitud de onda más larga que el compuesto quimioluminiscente y tiene un triplete de energía más bajo que el compuesto quimioluminiscente. El fotosensibilizador puede ser fotoactivable (por ejemplo, colorantes y compuestos aromáticos). El fotosensibilizador es generalmente un compuesto comprendido por átomos unidos covalentemente, usualmente con múltiples enlaces dobles o triples conjugados. El compuesto debe absorber la luz en el rango de longitud de onda de 200-1100 nm, usualmente de 300-1000 nm, preferiblemente de 450-950 nm. Los fotosensibilizadores típicos incluyen, pero no se limitan a, acetona, benzofenona, 9-tioxantona, eosina, 9,10-dibromoantraceno, azul de metileno, metalo-porfirinas (por ejemplo, hematoporfirina), ftalocianinas, clorofilas, rosa de bengala, bungminsterfullerina, por ejemplo, y derivados de estos compuestos. Ejemplos de otros fotosensibilizadores se enumeran en N.J. Turro, "Molecular Photochemistry", página 132, W. A. Benjamin Inc., N.Y 1965. El fotosensibilizador ayuda a la fotoactivación donde la activación es por oxígeno singlete. Usualmente, el fotosensibilizador absorbe luz y el fotosensibilizador excitado así formado activa el oxígeno para producir oxígeno singlete, que reacciona con el compuesto quimioluminiscente para dar un intermedio luminiscente metaestable.

45 En las fórmulas expuestas aquí, una línea de garabatos a través de un enlace indica el punto de unión de una unidad estructural en la fórmula.

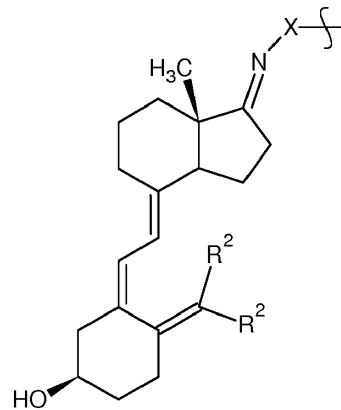
Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento están dirigidos a anticuerpos generados contra los compuestos de Fórmula IV, que son compuestos de Fórmula I en donde: R1 =



o H, en donde al menos uno de R<sup>1</sup> no es H.

Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento están dirigidos a asociados de unión tales como, por ejemplo, anticuerpos y aptámeros generados contra derivados de (7aS,E)-4-((Z)-2-((R)-5-hidroxi-2-metilen-ciclohexiliden)-etiliden)-7a-metiloctahidro-1H-inden-1-ona (derivados de HMCHEMOIO), o compuestos de Fórmula V, que son compuestos de Fórmula I en la que: R<sub>1</sub> =

5

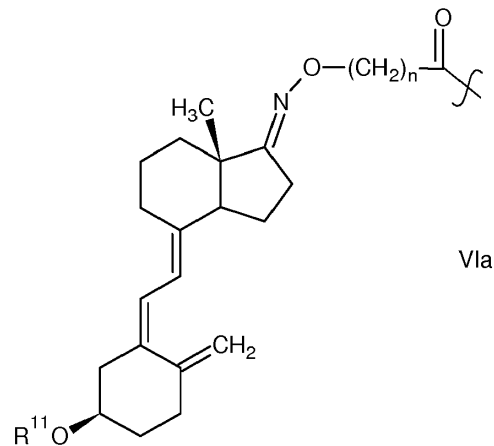


o H, en donde al menos uno de R<sup>1</sup> no es H.

Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento están dirigidos a asociados de unión tales como, por ejemplo, anticuerpos y aptámeros generados contra los compuestos de Fórmula VI, que son compuestos de Fórmula I en los que:

10

(R<sup>1</sup>)<sub>p</sub>-(L)<sub>q</sub>- es NHR<sup>1</sup>-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-NR<sup>1</sup>-((CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-NR<sup>1</sup>)<sub>s</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-NR<sup>7</sup>- en donde R<sup>1</sup> es independientemente

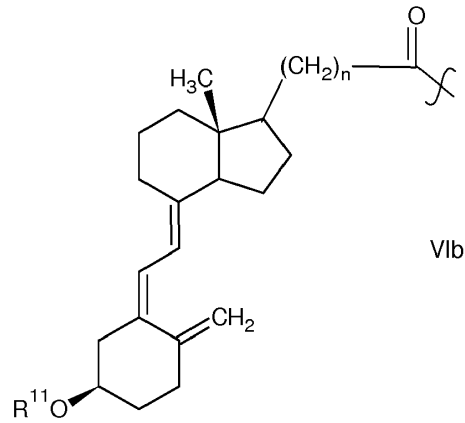


VIa

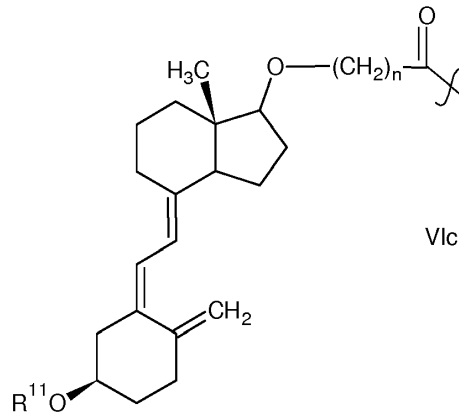
o

15





(no de acuerdo con la presente invención) o



o H,

5 en donde al menos uno de R<sup>1</sup> no es H,

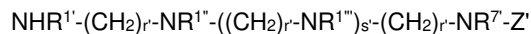
p, q y n son como se define arriba,

10 r es independientemente un entero de 1 a 10, o 1 a 9, o 1 a 8, o 1 a 7, o 1 a 6, o 1 a 5, o 1 a 4, o 1 a 3, o 1 a 2, o 2 a 10, o 2 a 9, o 2 a 8, o 2 a 7, o 2 a 6, o 2 a 5, o 2 a 4, o 2 a 3, o 3 a 10, o 3 a 9, o 3 a 8, o 3 a 7, o 3 a 6, o 3 a 5, o 3 a 4, o 4 a 10, o 4 a 9, o 4 a 8, o 4 a 7, o 4 a 6, o 4 a 5, o 5 a 10, o 5 a 9, o 5 a 8, o 5 a 7, o 5 a 6, o 6 a 10, o 6 a 9, o 6 a 8, o 6 a 7, o 7 a 10, o 7 a 9, o 7 a 8, o 8 a 10, o 8 a 9, o 9 a 10, por ejemplo,

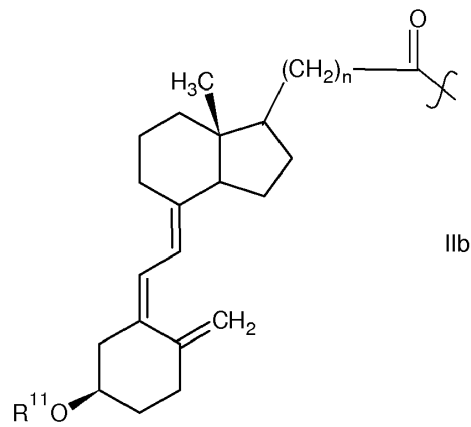
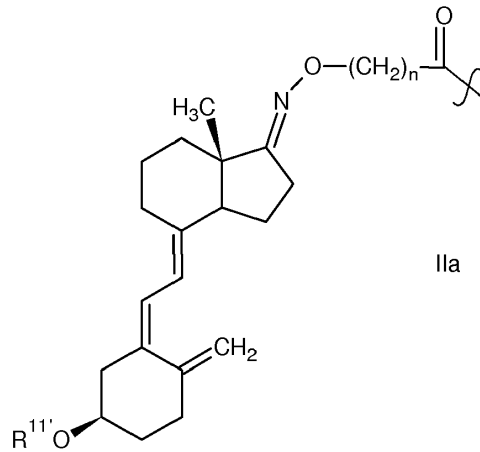
s es un entero de 1 a 10, o 1 a 9, o 1 a 8, o 1 a 7, o 1 a 6, o 1 a 5, o 1 a 4, o 1 a 3, o 1 a 2, o 2 a 10, o 2 a 9, o 2 a 8, o 2 a 7, o 2 a 6, o 2 a 5, o 2 a 4, o 2 a 3, o 3 a 10, o 3 a 9, o 3 a 8, o 3 a 7, o 3 a 6, o 3 a 5, o 3 a 4, o 4 a 10, o 4 a 9, o 4 a 8, o 4 a 7, o 4 a 6, o 4 a 5, o 5 a 10, o 5 a 9, o 5 a 8, o 5 a 7, o 5 a 6, o 6 a 10, o 6 a 9, o 6 a 8, o 6 a 7, o 7 a 10, o 7 a 9, o 7 a 8, o 8 a 10, o 8 a 9, o 9 a 10, por ejemplo, y

15 R<sup>7</sup> es H o alquilo; y que incluye mezclas de dos o más de los compuestos anteriores.

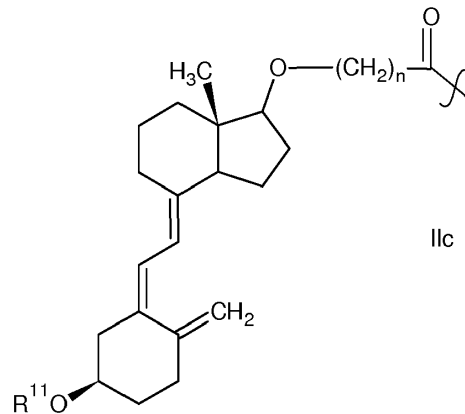
Algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento están dirigidos a anticuerpos generados contra compuestos de Fórmula II:



en donde R<sup>1</sup>, R<sup>1''</sup> o R<sup>1'''</sup> se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en



(no de acuerdo con la presente invención),



5 y H,

en donde al menos uno de R<sup>1'</sup>, R<sup>1''</sup> o R<sup>1'''</sup> no es H,

n y w son como se define arriba,

10 r' es independientemente un entero de 1 a 10, o 1 a 9, o 1 a 8, o 1 a 7, o 1 a 6, o 1 a 5, o 1 a 4, o 1 a 3, o 1 a 2, o 2 a 10, o 2 a 9, o 2 a 8, o 2 a 7, o 2 a 6, o 2 a 5, o 2 a 4, o 2 a 3, o 3 a 10, o 3 a 9, o 3 a 8, o 3 a 7, o 3 a 6, o 3 a 5, o 3 a 4, o 4 a 10, o 4 a 9, o 4 a 8, o 4 a 7, o 4 a 6, o 4 a 5, o 5 a 10, o 5 a 9, o 5 a 8, o 5 a 7, o 5 a 6, o 6 a 10, o 6 a 9, o 6 a 8, o 6 a 7, o 7 a 10, o 7 a 9, o 7 a 8, o 8 a 10, o 8 a 9, o 9 a 10, por ejemplo,

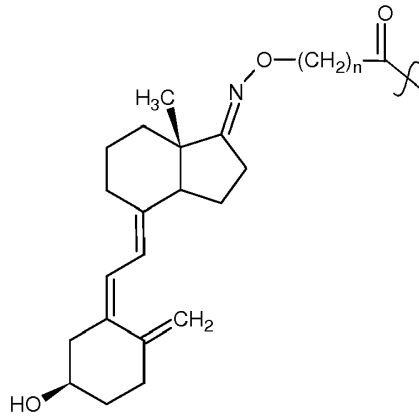
15 s' es un entero de 1 a 10, o 1 a 9, o 1 a 8, o 1 a 7, o 1 a 6, o 1 a 5, o 1 a 4, o 1 a 3, o 1 a 2, o 2 a 10, o 2 a 9, o 2 a 8, o 2 a 7, o 2 a 6, o 2 a 5, o 2 a 4, o 2 a 3, o 3 a 10, o 3 a 9, o 3 a 8, o 3 a 7, o 3 a 6, o 3 a 5, o 3 a 4, o 4 a 10, o 4 a 9, o 4 a 8, o 4 a 7, o 4 a 6, o 4 a 5, o 5 a 10, o 5 a 9, o 5 a 8, o 5 a 7, o 5 a 6, o 6 a 10, o 6 a 9, o 6 a 8, o 6 a 7, o 7 a 10, o 7 a 9, o 7 a 8, o 8 a 10, o 8 a 9, o 9 a 10, por ejemplo,

R<sup>7</sup> es H o alquilo,

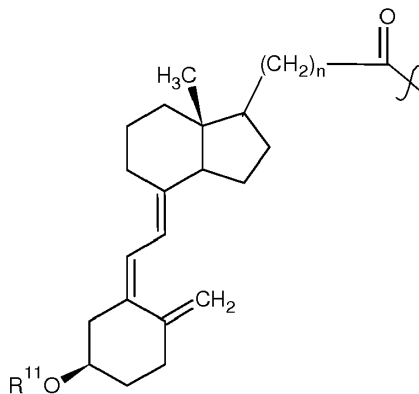
R<sup>11</sup> es H, alquilo, o acilo, y

Z' es un portador inmunogénico de poli(aminoácido) o un portador inmunogénico no poli(aminoácido); y que incluye mezclas de dos o más de los compuestos anteriores.

- 5 En algunos ejemplos, s' es 1. En algunos ejemplos, R<sup>7</sup> es H. En algunos ejemplos, r' es 2. En algunos ejemplos, R<sup>11</sup> y R<sup>11'</sup> son H; en algunos ejemplos, R<sup>11</sup> y R<sup>11'</sup> son H; y en algunos ejemplos, R<sup>11</sup> y R<sup>11'</sup> son H. En algunos ejemplos, ninguno de R<sup>11</sup>, R<sup>11'</sup> y R<sup>11''</sup> es H, es decir, R<sup>11</sup>, R<sup>11'</sup> y R<sup>11''</sup> son todos

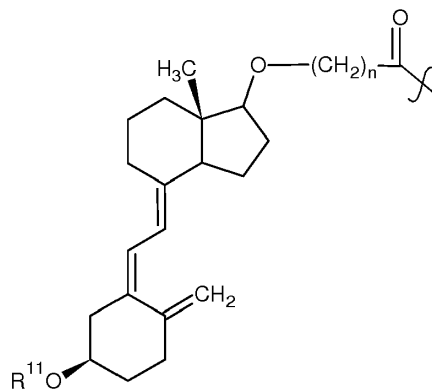


o



10

(no de acuerdo con la presente invención) o



#### Preparación de Compuestos

- 15 A continuación, se describen ejemplos de métodos para preparar compuestos que son derivados de HMCHEMOIO de acuerdo con los principios descritos en este documento, a modo de ilustración y no de limitación. Se pueden emplear otras metodologías para formar los compuestos anteriores y otros compuestos consistentes con los principios descritos en el presente documento.

- Un ejemplo de una preparación de un compuesto de Fórmula VII ((7a*S,E*)-4-((*Z*)-2-((*R*)-5-hidroxi-2-metilenciclohexiliden)etiliden)-7a-metiloctahidro-1*H*-indeno-1-ona) se expone en la Fig. 2. Con referencia a la Fig. 2, el compuesto de Fórmula VIII, en donde R<sup>11</sup>O es acetilo, se trata para formar el cetal de Fórmula IX. En un ejemplo, el compuesto de la Fórmula VIII se trata con etilenglicol en un disolvente aromático tal como el benceno en presencia de un ácido orgánico fuerte tal como, por ejemplo, ácido p-tolueno sulfónico, bajo condiciones (temperatura y tiempo) para la formación de un cetal. En algunos ejemplos, la reacción se lleva a cabo a reflujo durante un período de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 24 horas, o aproximadamente de 12 a aproximadamente 20 horas.
- El compuesto de la Fórmula IX se trata para introducir un grupo haluro tal como, por ejemplo, un grupo cloruro o un grupo bromuro. En un ejemplo, el compuesto de Fórmula IX se trata con N-bromosuccinimida y un iniciador de radicales libres tal como, por ejemplo, azobisisobutironitrilo en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un alcano (por ejemplo, hexano), por ejemplo, bajo condiciones para introducir un grupo bromuro en el compuesto de Fórmula IX para dar un compuesto de Fórmula X. En algunos ejemplos, la reacción se lleva a cabo a reflujo durante aproximadamente 30 minutos.
- El haluro del compuesto de Fórmula X se elimina para dar un compuesto de Fórmula XI que tiene dos dobles enlaces que están conjugados. En un ejemplo, el compuesto de Fórmula X se trata con una base suave tal como, por ejemplo, fluoruro de tetra-*n*-butilamonio, en un disolvente orgánico polar tal como, por ejemplo, un éter (por ejemplo, tetrahidrofurano), por ejemplo, bajo condiciones para eliminar un haluro de hidrógeno para formar un doble enlace (compuesto de Fórmula XI). En algunos ejemplos, la temperatura durante la reacción es de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C. El período de tiempo de la reacción es de aproximadamente 2 horas.
- El grupo acetilo (R<sup>11</sup>) del compuesto de Fórmula XI se elimina por tratamiento con una base inorgánica tal como, por ejemplo, hidróxido de sodio o hidróxido de potasio, en un disolvente orgánico polar tal como, por ejemplo, un alcohol (por ejemplo, metanol o etanol). Los componentes de la reacción se someten a condiciones para eliminar el grupo acetilo para dar el compuesto de la Fórmula XII. En algunos ejemplos, la temperatura durante la reacción es de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C, o a temperatura ambiente. El período de tiempo de la reacción es de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 8 horas.
- El grupo cetal del compuesto de Fórmula XII se elimina, por ejemplo, usando un ácido orgánico fuerte tal como, por ejemplo, ácido p-tolueno sulfónico, en una mezcla de agua y un disolvente orgánico polar tal como, por ejemplo, acetona, bajo condiciones para eliminar un cetal para producir el compuesto de Fórmula XIII. En algunos ejemplos, la temperatura durante la reacción es de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C. El período de tiempo de la reacción es de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 48 horas.
- El compuesto de Fórmula VII se forma al tratar el compuesto de Fórmula XIII con reactivos para abrir un anillo tal como, por ejemplo, el tratamiento con luz UV (foto reacción) en un solvente orgánico polar tal como, por ejemplo, un alcohol (por ejemplo, metanol o etanol), un éter (por ejemplo, éter etílico), una cetona (por ejemplo, acetona), o una combinación de dos o más de los anteriores, bajo condiciones para abrir un anillo de Fórmula XIII. En algunos ejemplos, la temperatura durante la foto reacción es de aproximadamente -20 °C a aproximadamente 0 °C. El período de tiempo de la foto reacción es de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 minutos, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 minutos. La foto reacción se sigue sometiendo a reflujo el intermedio en etanol durante aproximadamente 3 horas.
- La figura 3 representa, a modo de ilustración y no de limitación, un ejemplo de un método para preparar un compuesto de la Fórmula IIa (donde Z es BSA, a modo de ejemplo y no de limitación). Con referencia a la Fig. 3, el compuesto de Fórmula VII se hace reaccionar con ácido aminoacético (XIX) para formar la oxima de la Fórmula XX (ácido 2-((7a*S,E*)-4-((*Z*)-2-((*R*)-5-hidroxi-2-metilenciclohexiliden)etiliden)-7a-metiloctahidro-1*H*-inden-1-ilidenamino)acético). La reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un alcohol (por ejemplo, metanol o etanol), bajo condiciones para formar una oxima. En algunos ejemplos, la temperatura durante la reacción es de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 30 °C, o aproximadamente de 15 °C a aproximadamente 25 °C. El período de tiempo de la reacción es de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 30 horas, o de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 24 horas.
- En una reacción separada, un vehículo inmunogénico de poli(amino)ácido (en este ejemplo, BSA (Z' de Fórmula II es BSA), a modo de ilustración y no de limitación) se combina con un compuesto de fórmula XXI para formar un compuesto de la fórmula XXIa. La reacción se lleva a cabo en un medio acuoso regulado a un pH de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 7.0, o aproximadamente de 5.5 a aproximadamente 6.5, o aproximadamente a 6. Un agente de activación para facilitar la reacción de la funcionalidad de ácido carboxílico de BSA con uno o más del grupo o grupos amino de XXI se incluyen en el medio de reacción. Tales agentes de acoplamiento incluyen, pero no se limitan a, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDAC), N-hidroxisuccinimida (NHS) o Tetrafluoroborato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(N-succinimidil)uronio, o combinaciones de dos o más de los anteriores. La reacción se lleva a cabo bajo condiciones para formar una amida. En algunos ejemplos, la temperatura durante la reacción es de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C. El período de tiempo de la reacción es de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 24 horas, o de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 20 horas, o de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 10 horas, por ejemplo.

El compuesto de la Fórmula XX se trata con un agente de activación tal como, pero no se limita a, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC), N-hidroxisuccinimida (NHS), o tetrafluoroborato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(N-succinimidil)uronio, o combinaciones de dos o más de los anteriores, por ejemplo, para formar XX activado. La reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico polar tal como, por ejemplo, un alcohol (por ejemplo, metanol o etanol), un éter (por ejemplo, éter etílico o tetrahidrofurano), una cetona (por ejemplo, acetona), dimetilsulfóxido, acetonitrilo, diclorometano, o dimetilformamida (DMF), o una combinación de dos o más de los anteriores, que también pueden contener agua. En algunos ejemplos, la temperatura durante la reacción es de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 30 °C, o aproximadamente de 20 °C a aproximadamente 25 °C, o aproximadamente a temperatura ambiente. El período de tiempo de la reacción es de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 36 horas, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 horas. El XX activado se hace reaccionar con el compuesto de la Fórmula XXIa para dar un compuesto de la Fórmula IIa. Como se muestra, R<sup>1'</sup> es la unidad estructural del compuesto de la Fórmula IIa y R<sup>1''</sup> y R<sup>1'''</sup> son cada uno H. Sin embargo, consistente con los principios descritos en el presente documento, el producto resultante puede ser una mezcla de compuestos en donde en un compuesto de la mezcla R<sup>1'</sup> es la unidad estructural del compuesto de Fórmula IIa, y en otro compuesto de la mezcla R<sup>1'</sup> y R<sup>1''</sup> son ambos la unidad estructural del compuesto de Fórmula IIa, y en otro compuesto de la mezcla R<sup>1'</sup> y R<sup>1''</sup> son ambos la unidad estructural del compuesto de la Fórmula IIa, y en otro compuesto de la mezcla, los tres de R<sup>1'</sup> y R<sup>1''</sup> y R<sup>1'''</sup> son la unidad estructural del compuesto de la Fórmula IIa. La reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, DMF o DMSO, por ejemplo, bajo condiciones para formar una amida. En algunos ejemplos, la temperatura durante la reacción es de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 30 °C, o aproximadamente de 20 °C a aproximadamente 25 °C, o aproximadamente a temperatura ambiente. El período de tiempo de la reacción es de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 36 horas, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 horas.

La Fig. 4 representa, a modo de ilustración y no de limitación, un ejemplo alternativo de un método para preparar un compuesto de la Fórmula VIa y la conversión del compuesto de Fórmula VIa en un compuesto de la Fórmula IIa (donde Z es BSA, a modo de ejemplo y no de limitación). Con referencia a la Fig. 4, el compuesto de Fórmula VII se hace reaccionar con ácido aminooxiacético (XIX) para formar la oxima de la Fórmula XX. La reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un alcohol (por ejemplo, metanol o etanol), bajo condiciones para formar una oxima. En algunos ejemplos, la temperatura durante la reacción es de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 30 °C, o aproximadamente de 15 °C a aproximadamente 25 °C. El período de tiempo de la reacción es de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 30 horas, o de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 24 horas.

La oxima de la Fórmula XX se combina con un compuesto de la fórmula XXI para formar un compuesto de la fórmula VIa. La reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un alcano (por ejemplo, hexano o pentano, bajo condiciones para formar una amida. En algunos ejemplos, la temperatura durante la reacción es de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C. El período de tiempo de la reacción es de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 48 horas.

El compuesto de Fórmula VIa se hace reaccionar con un vehículo inmunogénico de poli(aminoácido) (Z' de Fórmula II es BSA, a modo de ilustración y no de limitación) para dar un compuesto de Fórmula IIa. Como se muestra, R<sup>1'</sup> es la unidad estructural del compuesto de la Fórmula IIa y R<sup>1''</sup> y R<sup>1'''</sup> son cada uno H. Sin embargo, consistente con los principios descritos en el presente documento, el producto resultante puede ser una mezcla de compuestos en donde en un compuesto de la mezcla R<sup>1'</sup> es la unidad estructural del compuesto de Fórmula IIa, y en otro compuesto de la mezcla R<sup>1'</sup> y R<sup>1''</sup> son ambos la unidad estructural del compuesto de Fórmula IIa, y en otro compuesto de la mezcla R<sup>1'</sup> y R<sup>1''</sup> son ambos la unidad estructural del compuesto de la Fórmula IIa, y en otro compuesto de la mezcla, los tres de R<sup>1'</sup> y R<sup>1''</sup> y R<sup>1'''</sup> son la unidad estructural del compuesto de la Fórmula IIa. La reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un alcano (por ejemplo, hexano o pentano), bajo condiciones para formar una amida. En algunos ejemplos, la temperatura durante la reacción es de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C. El período de tiempo de la reacción es de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 48 horas.

Otro ejemplo de un método para preparar ejemplos de compuestos de acuerdo con los principios descritos en este documento se describe, a modo de ilustración y no como limitación, con referencia a la Fig. 5. Se pueden emplear otras metodologías para formar los compuestos de acuerdo con los principios descritos en este documento. La preparación de un compuesto de Fórmula XVIII (Y es C en la Fórmula I) se muestra en la Fig. 5. Con referencia a la Fig. 5, se trata el compuesto de Fórmula VII (preparado, por ejemplo, como se describe en la Fig. 3) para proteger el grupo hidroxilo libre (R<sup>13</sup> es un grupo protector) para formar un compuesto de la Fórmula XIV. Las condiciones de la reacción dependen de la naturaleza del grupo protector, por ejemplo.

En un ejemplo, el compuesto de Fórmula VII se trata con cloruro de tert-butildimetilsililo bajo condiciones para formar un éter de sililo. La reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico polar tal como, por ejemplo, piridina, dimetilsulfóxido, un éter (por ejemplo, tetrahidrofurano, etil éter o 1,4-dioxano), acetonitrilo, diclorometano o dimetilformamida (DMF). En algunos ejemplos, la temperatura durante la reacción es de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 30 °C, o aproximadamente de 15 °C a aproximadamente 25 °C. El período de tiempo de la reacción es de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 30 horas, o de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 24 horas.

Ejemplos de grupos protectores, a modo de ejemplo y no de limitación, son grupos sililo (tales como, pero sin limitación, trimetilsililo, dimetilsililo, tert-butildimetilsililo, triisopropilsililo, tert-butildifenilsililo, por ejemplo), t-butoxicarbonilo (t-Boc), fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), acetaminomethyl (Acm), trifenil metilo (Trt), benciloxicarbonilo, bifenilisopropiloxicarbonilo, 1-amiloxicarbonilo, isoborniloxicarbonilo, alfa-dimetil-3,5-dimetoxibeniloxicarbonilo, o-nitrofenilsulfenilo, 2-ciano-1,1-dimetil-etoxicarbonilo, bromobenciloxi, carbamilo, y formilo, por ejemplo.

Un compuesto de la Fórmula XV se forma a partir del compuesto de la Fórmula XIV, por ejemplo, por reacción con un alfa-haloéster en presencia de zinc (reacción de Reformatsky). En este ejemplo, el compuesto de Fórmula XIV se trata con un reactivo Reformatsky tal como, por ejemplo,  $\text{BrZnCH}_2\text{COOR}^{14}$  (Zn y etil-alfa-bromoacetato en el ejemplo mostrado,  $w = 1$ ) para dar el compuesto de Fórmula XV. La reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un éter (por ejemplo, tetrahidrofurano o éter etílico) o un disolvente aromático (por ejemplo, benceno o tolueno). En algunos ejemplos, la temperatura durante la reacción es de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 100 °C, o aproximadamente de 10 °C a aproximadamente 90 °C. El período de tiempo de la reacción es de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 24 horas.

El grupo hidroxilo libre del compuesto de Fórmula XV se reduce para formar un compuesto de la Fórmula XVI. El compuesto de Fórmula XV puede tratarse para reducir el grupo hidroxilo mediante métodos que incluyen, pero no se limitan a, la formación de éster de tosilato seguido de un tratamiento con un hidruro metálico tal como, por ejemplo,  $\text{LiAlH}_4$  o  $\text{NaBH}_4$ ; eliminación del hidroxilo para formar un alqueno (tal como, por ejemplo, por tratamiento con un ácido orgánico concentrado, por ejemplo, ácido sulfúrico concentrado o ácido clorhídrico concentrado) seguido de hidrogenación en presencia de un catalizador tal como, por ejemplo, platino o paladio; por ejemplo. Las condiciones para la reacción dependen de uno o ambos de la naturaleza de los reactivos empleados y la naturaleza del disolvente, por ejemplo.

El compuesto resultante de la Fórmula XVI se trata para hidrolizar el grupo éster a un grupo de ácido carboxílico (reacción de desesterificación) para dar el compuesto de la Fórmula XVII. Hay numerosas metodologías disponibles para la desesterificación e incluyen, pero no se limitan a, saponificación o tratamiento con una base acuosa tal como, por ejemplo,  $\text{NaOH}$  o  $\text{KOH}$  con calor; o hidrólisis ácida o tratamiento con un ácido acuoso tal como, por ejemplo, un ácido mineral acuoso (tal como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico), por ejemplo. Las condiciones para la reacción dependen de uno o más de la naturaleza de los reactivos y la naturaleza del éster, por ejemplo.

Un compuesto de la Fórmula XVIII se forma mediante la eliminación del grupo protector  $\text{R}^{13}$  del compuesto de la Fórmula XVII. Se pueden emplear diversas metodologías para la eliminación de grupos protectores e incluyen, pero no se limitan a, el tratamiento con ácido mineral diluido (tal como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico; tratamiento con un ácido orgánico (tal como, por ejemplo, ácido acético, en un disolvente orgánico polar (tal como, por ejemplo, un alcohol (por ejemplo, metanol o etanol), un éter (por ejemplo, éter etílico o tetrahidrofurano), una cetona (por ejemplo, acetona), dimetilsulfóxido, acetonitrilo, diclorometano, o dimetilformamida (DMF), o una combinación de dos o más de los anteriores, que también puede contener agua, bajo condiciones para eliminar el grupo protector para producir el compuesto de Fórmula XVIII. Las condiciones para la reacción dependen de uno o más de la naturaleza de los reactivos y la naturaleza del grupo protector, por ejemplo.

La figura 6 representa, a modo de ilustración y no de limitación, un ejemplo de un método para preparar un compuesto de la Fórmula VIb y la conversión del compuesto de la Fórmula VIb en un compuesto de la Fórmula IIb (donde  $\text{Z}'$  es KLH, a manera de ejemplo y no de limitación). Con referencia a la Fig. 6, el compuesto de Fórmula XVIII se trata para activar el grupo de ácido carboxílico tal como, pero sin limitarse a, la reacción para formar un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) (compuesto de Fórmula XXII). La reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico polar tal como, por ejemplo, dimetilsulfóxido, un éter (por ejemplo, tetrahidrofurano o éter etílico), acetonitrilo, diclorometano o dimetilformamida (DMF), por ejemplo, bajo condiciones para formar un éster de NHS. En algunos ejemplos, la temperatura durante la reacción es de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C. El período de tiempo de la reacción es de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 48 horas.

El éster NHS de la Fórmula XXII se combina con un compuesto de la fórmula XXI para formar el compuesto de la fórmula VIb. La reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un alcano (por ejemplo, hexano o pentano), por ejemplo, bajo condiciones para formar una amida. En algunos ejemplos, la temperatura durante la reacción es de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C. El período de tiempo de la reacción es de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 48 horas.

El compuesto de fórmula VIb se hace reaccionar con un vehículo inmunogénico de poli(amino)ácido ( $\text{Z}'$  de fórmula II es KLH, por ejemplo) para dar un compuesto de fórmula IIb. Como se muestra,  $\text{R}^{1'}$  es la unidad estructural del compuesto de la Fórmula IIb y  $\text{R}^{1''}$  y  $\text{R}^{1'''}$  son cada uno H. Sin embargo, consistente con los principios descritos en el presente documento, el producto resultante puede ser una mezcla de compuestos en donde en un compuesto de la mezcla  $\text{R}^{1'}$  es la unidad estructural del compuesto de Fórmula IIa, y en otro compuesto de la mezcla  $\text{R}^{1'}$  y  $\text{R}^{1''}$  son ambos la unidad estructural del compuesto de Fórmula IIa, y en otro compuesto de la mezcla  $\text{R}^{1'}$  y  $\text{R}^{1''}$  son ambos la unidad estructural del compuesto de la Fórmula IIa, y en otro compuesto de la mezcla, los tres de  $\text{R}^{1'}$  y  $\text{R}^{1''}$  y  $\text{R}^{1'''}$  son la unidad estructural del compuesto de la Fórmula IIb. La reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un alcano (por ejemplo, hexano o pentano), bajo condiciones para formar una amida. En algunos

ejemplos, la temperatura durante la reacción es de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C. El período de tiempo de la reacción es de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 48 horas.

En una ruta alternativa, un compuesto de la Fórmula IIb se puede preparar a partir de un compuesto de la Fórmula XVIII de una manera similar a la descrita anteriormente para la Fig. 3 para la preparación del compuesto de la Fórmula IIa.

Otro ejemplo de un método para preparar ejemplos de compuestos de acuerdo con los principios descritos en este documento se describe, a modo de ilustración y sin limitación, con referencia a la Fig. 7. Se pueden emplear otras metodologías para formar los compuestos de acuerdo con los principios descritos en este documento. La preparación de un compuesto de Fórmula XXVII (Y es O en la Fórmula I y w es 0 a 10 o 1 a 10) se muestra en la Fig. 7. Con referencia a la Fig. 7, el compuesto de la Fórmula VII (preparado, por ejemplo, como se describe en la Fig. 2) se trata para proteger el grupo hidroxilo libre (R<sup>15</sup> es un grupo protector) para formar un compuesto de la Fórmula XXIII. Las condiciones de la reacción dependen de la naturaleza del grupo protector, por ejemplo.

En un ejemplo, el compuesto de Fórmula VII se trata con cloruro de tert-butildimetilsililo (a modo de ejemplo y sin limitación) bajo condiciones para formar un éter de sililo. La reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico polar tal como, por ejemplo, piridina, dimetilsulfóxido, un éter (por ejemplo, tetrahidrofurano, etil éter o 1,4-dioxano), acetonitrilo, diclorometano o dimetilformamida (DMF). En algunos ejemplos, la temperatura durante la reacción es de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C. El período de tiempo de la reacción es de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 48 horas.

Un compuesto de la Fórmula XXIV se forma a partir del compuesto de la Fórmula XXIII por reducción del grupo cetona a un grupo hidroxilo, por ejemplo. El compuesto de Fórmula XXIII puede tratarse para reducir el grupo hidroxilo mediante métodos que incluyen, pero no se limitan a, tratamiento con un hidruro metálico tal como, por ejemplo, LiAlH<sub>4</sub> o NaBH<sub>4</sub>, para dar el compuesto de Fórmula XXIV. La reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un alcohol (por ejemplo, etanol). En algunos ejemplos, la temperatura durante la reacción es de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 25 °C. El período de tiempo de la reacción es de aproximadamente 0.5 horas a aproximadamente 4 horas.

Un compuesto de la Fórmula XXV se forma a partir del compuesto de la Fórmula XXIV mediante, por ejemplo, reacción con un haloéster (tal como, a modo de ejemplo y sin limitación) un alfa-haloéster en presencia de una base. En este ejemplo, el compuesto de Fórmula XXV se trata con, por ejemplo, BrCH<sub>2</sub>COOR<sup>16</sup> (alfa-bromoacetato de etilo en el ejemplo mostrado, w es 1 y R<sup>16</sup> es etilo) para dar el compuesto de Fórmula XXV. La reacción se lleva a cabo formando un ion alcóxido a partir del grupo hidroxilo del compuesto de Fórmula XXIV en presencia de una base tal como, por ejemplo, KOH, NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, o K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, y reacción del alcóxido con el haloéster. El solvente para la reacción es un solvente acuoso, que puede contener de 1% a 40% de un solvente orgánico polar tal como se describió anteriormente. En algunos ejemplos, la temperatura durante la reacción es de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 100 °C, o de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 90 °C, por ejemplo. El período de tiempo de la reacción es de aproximadamente 0.5 horas a aproximadamente 24 horas, o de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 8 horas, por ejemplo.

El compuesto resultante de la Fórmula XXV se trata para hidrolizar el grupo éster a un grupo de ácido carboxílico (reacción de desesterificación) para dar el compuesto de la Fórmula XXVI. Existen numerosas metodologías disponibles para la desesterificación e incluyen, pero no se limitan a, saponificación o tratamiento con una base acuosa tal como, por ejemplo, NaOH o KOH, con calor; hidrólisis ácida o tratamiento con un ácido acuoso tal como, por ejemplo, un ácido mineral acuoso (como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, por ejemplo). Las condiciones de la reacción dependen de una o más de la naturaleza de los reactivos y la naturaleza del éster, por ejemplo.

Un compuesto de la Fórmula XXVII se forma mediante la eliminación del grupo protector R<sup>15</sup> del compuesto de Fórmula XXVI. Pueden emplearse diversas metodologías para la eliminación de grupos protectores e incluyen, pero no se limitan a, tratamiento con ácido mineral diluido (tal como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico); tratamiento con un ácido orgánico (tal como, por ejemplo, ácido acético), en un disolvente orgánico polar (tal como, por ejemplo, un alcohol (por ejemplo, metanol o etanol), un éter (por ejemplo, éter etílico, tetrahidrofurano, o 1,4-dioxano), una cetona (por ejemplo, acetona), dimetilsulfóxido, acetonitrilo, diclorometano, dimetilformamida (DMF), o una combinación de dos o más de los anteriores, que también pueden contener agua, bajo condiciones para eliminar el grupo protector para producir el compuesto de Fórmula XXVII. Las condiciones para la reacción dependen de uno o más de la naturaleza de los reactivos y la naturaleza del grupo protector, por ejemplo.

La Fig. 8 representa, a modo de ilustración y no de limitación, un ejemplo de un método para preparar un compuesto de la Fórmula VIc y la conversión del compuesto de la Fórmula VIc en un compuesto de la Fórmula IIc (donde Z' es la enzima G6PDH, a modo de ejemplo y no de limitación). Con referencia a la Fig. 8, el compuesto de Fórmula XXVII se trata para activar el grupo ácido carboxílico tal como, pero sin limitarse a, una reacción para formar un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) (compuesto de Fórmula XXVIII). La reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico polar tal como, por ejemplo, dimetilsulfóxido, un éter (por ejemplo, tetrahidrofurano, etil éter o 1,4-dioxano), acetonitrilo, diclorometano o dimetilformamida (DMF), por ejemplo, bajo condiciones para formar un éster de NHS. En algunos

ejemplos, la temperatura durante la reacción es de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C. El período de tiempo de la reacción es de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas.

5 El éster NHS de la Fórmula XXVIII se combina con un compuesto de la Fórmula XXI para formar un compuesto de la fórmula VIc. La reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un alcano (por ejemplo, hexano o pentano), por ejemplo, bajo condiciones para formar una amida. En algunos ejemplos, la temperatura durante la reacción es de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C. El período de tiempo de la reacción es de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas.

10 El compuesto de Fórmula VIc se hace reaccionar con la enzima, G6PDH (Z' de Fórmula II es G6PDH, por ejemplo), para dar un compuesto de Fórmula IIc. Como se muestra, R<sup>1</sup> es la unidad estructural del compuesto de Fórmula IIc y R<sup>1'</sup> y R<sup>1''</sup> son cada uno H. Sin embargo, consistente con los principios descritos en el presente documento, el producto resultante puede ser una mezcla de compuestos en donde en un compuesto de la mezcla R<sup>1</sup> es la unidad estructural del compuesto de Fórmula IIa, y en otro compuesto de la mezcla R<sup>1</sup> y R<sup>1''</sup> son ambos la unidad estructural del compuesto de Fórmula IIa, y en otro compuesto de la mezcla R<sup>1</sup> y R<sup>1''</sup> son ambos la unidad estructural del compuesto de la Fórmula IIa, y en otro compuesto de la mezcla, los tres de R<sup>1</sup> y R<sup>1'</sup> y R<sup>1''</sup> son la unidad estructural del compuesto de la Fórmula IIc. La reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un alcano (por ejemplo, hexano o pentano), bajo condiciones para formar una amida. En algunos ejemplos, la temperatura durante la reacción es de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C. El período de tiempo de la reacción es de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas.

20 En una ruta alternativa, un compuesto de la Fórmula IIc se puede preparar a partir de un compuesto de la Fórmula XXVII de una manera similar a la descrita anteriormente para la Fig. 3 para la preparación del compuesto de la Fórmula IIa.

Otros compuestos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento pueden prepararse de una manera similar a la descrita anteriormente.

#### Preparación de los asociados de unión

25 Pueden emplearse ejemplos de compuestos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento donde Z es un vehículo inmunogénico de poli(aminoácido) o un vehículo inmunógeno no de poli(aminoácido) para preparar asociados de unión para la vitamina D tal como, por ejemplo, aptámeros para vitamina D o anticuerpos para la vitamina D, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos específicos para la vitamina D<sub>3</sub>, anticuerpos específicos para la vitamina D<sub>2</sub>, anticuerpos específicos para la 25-hidroxitamina D<sub>3</sub>, anticuerpos específicos para la 25-hidroxitamina D<sub>2</sub>, anticuerpos específicos para 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>3</sub>, y anticuerpos específicos para 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>2</sub>, por ejemplo. De particular interés son los anticuerpos específicos para 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>3</sub>, los anticuerpos específicos para 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>2</sub> y los anticuerpos específicos para epímeros de otros compuestos de vitamina D ("anticuerpos para la vitamina D epimérica"), que pueden ser empleados en ensayos para 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>3</sub> y para 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>2</sub>, o que puede emplearse en ensayos para vitamina D no epimérica para reducir o eliminar la interferencia de formas epiméricas de vitamina D, tales como , por ejemplo, 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>3</sub> y de 3-epi-25-hidroxitamina D<sub>2</sub>, que pueden estar presentes en una muestra para probar la presencia de vitamina D.

40 Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales y pueden incluir una inmunoglobulina completa o un fragmento de la misma, cuyas inmunoglobulinas incluyen, pero no se limitan a, diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, por ejemplo. Sus fragmentos pueden incluir Fab, Fv y F(ab')<sub>2</sub>, Fab' y similares. Además, pueden usarse agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos cuando sea apropiado, siempre que se mantenga la afinidad de unión a una molécula particular.

45 Los anticuerpos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento pueden prepararse mediante técnicas que incluyen, pero no se limitan a, la inmunización de un huésped y la recolección de sueros (policlonales), preparando líneas celulares híbridas continuas y recolectando la proteína secretada (monoclonal) o clonando y expresando secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de las mismas que codifican al menos las secuencias de aminoácidos requeridas para la unión específica de anticuerpos naturales, por ejemplo.

50 Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante técnicas tales como la preparación de líneas celulares híbridas continuas y la recolección de la proteína secretada (técnicas de hibridación de células somáticas). Los anticuerpos monoclonales pueden producirse de acuerdo con las técnicas estándar de Kohler and Milstein, Nature 265: 495-497, 1975. Las revisiones de las técnicas de anticuerpos monoclonales se encuentran en Lymphocyte Hybridomas, ed. Melchers, et al. Springer-Verlag (Nueva York 1978), Nature 266: 495 (1977), Science 208: 692 (1980) y Methods of Enzymology 73 (Part B): 3-46 (1981).

55 En otra metodología para la preparación de anticuerpos, la secuencia que codifica los sitios de unión de anticuerpos puede escindirse del ADN del cromosoma e insertarse en un vector de clonación, que puede expresarse en bacterias para producir proteínas recombinantes que tienen los correspondientes sitios de unión de anticuerpos. Esta metodología implica la clonación y expresión de secuencias de nucleótidos o sus versiones mutagenizadas que codifican al menos las secuencias de aminoácidos necesarias para la unión específica de anticuerpos naturales.



En una metodología para la producción de anticuerpos monoclonales, una primera etapa incluye la inmunización de un animal productor de anticuerpos, tal como un ratón, una rata, una cabra, una oveja o una vaca con un inmunógeno que comprende un compuesto de Fórmula I en donde Z es un portador inmunogénico, por ejemplo. La inmunización se puede realizar con o sin un adyuvante, tal como el adyuvante completo de Freund u otros adyuvantes, tales como el monofosforil lípido A y el adyuvante sintético de dicorinomicolato de trehalosa. Una siguiente etapa incluye el aislamiento de las células del bazo del animal productor de anticuerpos y la fusión de las células del bazo productoras de anticuerpos con un asociado de fusión apropiado, típicamente una célula de mieloma, tal como el uso de polietilenglicol u otras técnicas. Típicamente, las células de mieloma utilizadas son aquellas que crecen normalmente en medio de hipoxantina-timidina (HT) pero no pueden crecer en medio de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), que se utiliza para la selección de las células fusionadas. Una etapa siguiente incluye la selección de las células fusionadas, típicamente mediante la selección en medio HAT. Una siguiente etapa incluye la selección de los híbridos clonados para la producción apropiada de anticuerpos usando inmunoensayos tales como, por ejemplo, un ensayo de inmunosorbente enlazado a enzima (ELISA) u otros inmunoensayos apropiados para la selección.

Un anticuerpo (preparado a partir de un inmunógeno de acuerdo con los principios descritos en el presente documento) con la especificidad requerida puede seleccionarse mediante metodologías de cribado, que incluyen, a modo de ilustración y sin limitación, ELISA, inmunoprecipitación de mancha, análisis de Western y Resonancia de Plasmón de Superficie, por ejemplo. De esta manera, se obtiene un anticuerpo que se une a un analito de interés de la vitamina D y no se une en ningún grado detectable a una molécula de vitamina D que no es de interés en un ensayo particular. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en este documento, un anticuerpo que se une a un analito de interés de vitamina D tiene una afinidad de enlace por el analito de interés de vitamina D de aproximadamente  $10^7$  a aproximadamente  $10^{14}$  litros/mol, o aproximadamente de  $10^7$  a aproximadamente  $10^{11}$  litros/mol, o aproximadamente  $10^7$  a aproximadamente  $10^{12}$  litros/mol, o aproximadamente  $10^8$  a aproximadamente  $10^{14}$  litros/mol, o aproximadamente  $10^8$  a aproximadamente  $10^{11}$  litros/mol, o aproximadamente  $10^8$  a aproximadamente  $10^{12}$  litros/mol, por ejemplo. La expresión "cualquier grado detectable" significa que el anticuerpo que se une específicamente a un analito de interés de vitamina D (por ejemplo, 3- $\pi$ -25-hidroxivitamina D) tiene una afinidad de enlace por una molécula de vitamina D que no es de interés (por ejemplo, un compuesto no epi-vitamina D) de menos de aproximadamente  $10^4$  litros/mol, o menos de aproximadamente  $10^3$  litros/mol, o menos de aproximadamente  $10^2$  litros/mol, o menos de aproximadamente 10 litros/mol, por ejemplo.

En un ejemplo de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, se emplea un inmunógeno, preparado a partir de un compuesto de la Fórmula I anterior en donde Z es un vehículo inmunogénico, para preparar anticuerpos que son específicos para la 3-epi-25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> donde los anticuerpos no se unen a ningún grado detectable con 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> ni a otras variantes de la vitamina D, incluidos los compuestos que no son de epi-vitamina D, tales como por ejemplo la 25-hidroxivitamina D; calcidiol; 1,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub>; 1,25-dihidroxi vitamina D<sub>4</sub>; 1,25-dihidroxi vitamina D<sub>5</sub>; y 1,25-dihidroxi vitamina D<sub>6</sub>, por ejemplo.

En otro ejemplo de acuerdo con los principios descritos en este documento, se emplea un inmunógeno, preparado a partir de un compuesto de la Fórmula I anterior en donde Z es un vehículo inmunogénico, para preparar anticuerpos que son específicos para la 3-epi-25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> donde los anticuerpos no se unen a ningún grado detectable con con 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> ni a otras variantes de vitamina D, incluidos los compuestos que no son de epi-vitamina D, tal como por ejemplo la 25-hidroxivitamina D; calcidiol; 1,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub>; 1,25-dihidroxi vitamina D<sub>4</sub>; 1,25-dihidroxi vitamina D<sub>5</sub>; y 1,25-dihidroxi vitamina D<sub>6</sub>, por ejemplo.

En un ejemplo, a modo de ilustración y no de limitación, se emplea un inmunógeno en donde Z en el compuesto de Fórmula I es BSA. Este inmunógeno se usa para inmunizar ratones (por ejemplo, ratones BALB/c, ratones Swiss Webster o una cepa de ratones AJ) por vía intraperitoneal. Las muestras de suero de estos ratones se probaron para detectar anticuerpos anti-3-epi-25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> utilizando un conjugado de 3-epi-25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> y ovoalbúmina (conjugado de ovoalbúmina). Se emplea un ELISA en placa de microtitulación y se examinan los anticuerpos para determinar su unión al conjugado de ovoalbúmina y subsecuentemente a 3-epi-25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>. Los ratones con títulos más altos se refuerzan tres días antes de la fusión. El día de la fusión, las células de bazo se recolectan de estos ratones y se fusionan con la línea celular de mieloma P3X63Ag8.653 utilizando protocolos de fusión asistidos por PEG. Después de aproximadamente diez días, los sobrenadantes de hibridomas se analizan en busca de anticuerpos anti-3-epi-25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> utilizando una placa ELISA. Los clones positivos se expanden adicionalmente, se subclonan y los sobrenadantes se purifican utilizando una columna de proteína A sepharose. Las muestras de anticuerpos purificadas se analizan utilizando ELISA para unirse al conjugado de ovoalbúmina y liberar 3-epi-25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>.

Los ejemplos particulares, a título ilustrativo y no limitativo, de anticuerpos preparados como se describió anteriormente que son específicos para 3-epi-25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> o específicos para 3-epi-25-hidroxivitamina D<sub>2</sub>, incluyen el anticuerpo 4G8 y el anticuerpo 8F10, por ejemplo.

En algunos ejemplos, se pueden emplear asociados de unión tales como, por ejemplo, anticuerpos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento para purificar compuestos de vitamina D. Por ejemplo, los anticuerpos tales como los descritos anteriormente pueden unirse a un soporte y al soporte empleado para purificar los compuestos de vitamina D. En un ejemplo, los anticuerpos para 3-epi-25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> se pueden unir a un sustrato de cromatografía de purificación por afinidad tal como, por ejemplo, una columna, y las preparaciones de

vitamina D se pueden poner en contacto con el sustrato de cromatografía donde el anticuerpo sobre el sustrato se une a 3- $\beta$ -epi-25-hidroxitamina D<sub>3</sub> de la preparación de vitamina D, mientras que otros compuestos de vitamina D se eluyen del sustrato.

#### Etapa de examen

5 En una siguiente etapa de un método de ensayo, el medio se examina para detectar la presencia de un complejo que comprende el analito epimérico de vitamina D y el asociado de unión, tal como, por ejemplo, un anticuerpo para el analito epimérico de vitamina D y/o un complejo que comprende un análogo de vitamina D y un asociado de unión para el analito epimérico de vitamina D. La presencia y/o cantidad de uno o ambos de los complejos indica la presencia y/o cantidad del analito epimérico de vitamina D en la muestra.

10 La expresión "medir la cantidad de un analito epimérico de vitamina D" se refiere a la determinación cuantitativa, semicuantitativa y cualitativa de la vitamina D epimérica. Los métodos que son cuantitativos, semicuantitativos y cualitativos, así como todos los demás métodos para determinar el analito epimérico de vitamina D, se consideran métodos para medir la cantidad del analito epimérico de vitamina D. Por ejemplo, un método, que simplemente detecta la presencia o ausencia del analito epimérico de vitamina D en una muestra sospechosa de contener el analito epimérico de vitamina D, se considera que está incluido dentro del alcance de la presente invención. Los términos "detección" y "determinación", así como otros sinónimos comunes para medir, se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

20 En muchas realizaciones, el examen del medio implica la detección de una señal del medio. La presencia y/o cantidad de la señal está relacionada con la presencia y/o cantidad del analito epimérico de vitamina D en la muestra. El modo particular de detección depende de la naturaleza del sistema que produce la señal. Como se discutió anteriormente, existen numerosos métodos por los cuales un marcador de una señal que produce una señal puede producir una señal detectable por medios externos. La activación de un sistema de producción de señales depende de la naturaleza de los miembros del sistema de producción de señales.

25 Las temperaturas durante las mediciones generalmente varían de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 70 °C o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 45 °C, o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C, por ejemplo. En una metodología, se forman curvas estándar utilizando concentraciones conocidas de analito de vitamina D. También se pueden usar calibradores y otros controles.

30 La luminiscencia o la luz producida a partir de cualquier marcador se puede medir de forma visual, fotográfica, actinométrica, espectrofotométrica, tal como mediante el uso de un fotomultiplicador o un fotodiodo, o por cualquier otro medio conveniente para determinar la cantidad de la misma, que se relaciona con la cantidad de analito epimérico de vitamina D en el medio. La examinación de la presencia y/o cantidad de la señal también incluye la detección de la señal, que generalmente es simplemente una etapa en la que se lee la señal. La señal se lee normalmente usando un instrumento, cuya naturaleza depende de la naturaleza de la señal. El instrumento puede ser, pero no se limita a, un espectrofotómetro, un fluorómetro, un espectrómetro de absorción, un luminómetro y un quimioluminómetro, por ejemplo.

Kits que comprenden reactivos para la realización de ensayos.

40 Los kits que comprenden reactivos para realizar ensayos pueden formularse con base en la naturaleza de un ensayo en particular. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, un kit puede comprender un asociado de unión tal como, por ejemplo, un anticuerpo para un epímero de vitamina D, cuyo anticuerpo se genera contra un inmunógeno que es un compuesto de la Fórmula I en donde Z es un portador inmunogénico. En algunos ejemplos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento, un kit puede comprender un reactivo que es un compuesto de la Fórmula I en donde Z es una unidad estructural de marcador de de poli(aminoácido) o una unidad estructural de marcador de no poli(aminoácido) que incluye un soporte. Un kit también puede incluir otros reactivos para realizar un ensayo particular para un analito epimérico de vitamina D. En algunas realizaciones, un kit comprende en combinación empaquetada un asociado de unión a biotina tal como, por ejemplo, avidina o estreptavidina, asociada con una partícula, compuesto biotinilado de Fórmula I y un anticuerpo marcado para el analito epimérico de vitamina D. El kit puede incluir además otros reactivos para realizar el ensayo, cuya naturaleza depende del formato de ensayo particular.

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

55 Las cantidades relativas de los diversos reactivos en los kits se pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones de los reactivos que optimizan sustancialmente las reacciones que deben suceder durante los presentes métodos y además para optimizar sustancialmente la sensibilidad de un ensayo. Bajo circunstancias apropiadas, uno o más de los reactivos en el kit pueden proporcionarse como un polvo seco, usualmente liofilizado, incluidos los excipientes, que en la disolución proporcionarán una solución de reactivo que tenga las concentraciones adecuadas para realizar un método o ensayo utilizando un reactivo compuesto de acuerdo con los principios descritos

en este documento. El kit puede incluir además una descripción escrita de un método que utiliza reactivos que incluyen un reactivo compuesto de acuerdo con los principios descritos en este documento.

5 La expresión "al menos" como se usa en este documento significa que el número de ítems especificados puede ser igual o mayor que el número citado. La expresión "aproximadamente" como se usa en este documento significa que el número citado puede diferir en más o menos 10%; por ejemplo, "aproximadamente 5" significa un rango de 4.5 a 5.5.

10 La siguiente discusión está dirigida a ejemplos específicos de acuerdo con los principios descritos aquí a modo de ilustración y no de limitación; los ejemplos específicos no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación y las reivindicaciones adjuntas. Pueden idearse numerosas modificaciones y composiciones, métodos y sistemas alternativos sin apartarse del espíritu y alcance de la presente divulgación.

### Ejemplos

A menos que se indique otra cosa, los materiales en los experimentos a continuación se pueden adquirir de Sigma-Aldrich Chemical Corporation (St. Louis MO) o Fluka Chemical Corporation (Milwaukee WI). Las partes y porcentajes divulgados en este documento son en peso a volumen a menos que se indique otra cosa.

15 Definiciones:

mg = miligramo

g = gramo (s)

ng = nanogramo (s)

ml = mililitro (s)

20  $\mu$ l = microlitro (s)

$\mu$ mol = micromolar

$^{\circ}$ C = grados centígrados

min = minuto (s)

seg = segundo (s)

25 hr = hora (s)

p/v = peso a volumen

TLC = cromatografía en capa fina

HPLC = cromatografía líquida de alto rendimiento

EDA = etilendiamina

30 EtOAc = acetato de etilo

DMF = dimetilformamida

DMSO = dimetilsulfóxido

MeOP = 1-metoxi-2-propanol

MES = ácido 2- (N-morfolino)etanosulfónico

35 CMO = carboximetoxioxima

TMB = tetrametil benzidina

SNHS = sulfo-N-hidroxisuccinimida

Regulador de lavado de pH alto =  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  5.5 mM +  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  4.4 mM, pH 11

40 Regulador de lavado Hapten = HEPES 50 mM, NaCl 300 mM, EDTA 1 mM, TRITON® X405 al 0.1%, conservante PROCLIN® al 0.15% y neomicina 1 mg/ml

DI = desionizado

ELISA = ensayo inmunosorbente ligado a enzima

UPA = Analizador de partículas ultra

LOCI = inmunoensayo de canalización de oxígeno luminiscente

BSA = albúmina de suero bovino

5 BGG = gamma globulina bovina

mIgG = inmunoglobulina de ratón

MS = espectrometría de masas

### Ejemplo 1

Preparación de compuestos de la Fig. 2 donde R<sup>11</sup> es acetilo

10 Se hizo reaccionar acetato de 5-androsten-3 $\alpha$ -ol-17-ona (VIII) (100 mg) con etilenglicol (0.245 ml) y monohidrato de ácido p-toluensulfónico (4 mg) en benceno bajo reflujo durante la noche para dar etilen cetal acetato de 5-androsten-3 $\alpha$ -ol-17-ona (IX) (112 mg). El etilen cetal IX (112 mg) se sometió a bromación con N-bromosuccinimida (69 mg)/azoisobutironitrilo (3.3 mg) en hexano (13 ml) bajo reflujo durante 30 minutos para dar el compuesto X, seguido de deshidrobromación con fluoruro de tetrabutylamonio (1 M en THF, 1.6 ml) en THF (7.3 ml) a temperatura ambiente durante 2 horas para dar etilen cetal acetato de androsta-5,7-dien-3 $\alpha$ -ol-17-ona (XI) (55 mg). Se hizo reaccionar acetato de etilen-cetal de Androsta-5,7-dien-3 $\alpha$ -ol-17-ona (XI) (55 mg) con hidróxido de sodio IN (2 ml) en metanol (10 ml) a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 horas para dar etilen cetal de androsta-5,7-dien-3 $\alpha$ -ol-17-ona (XII) (48 mg). Se hizo reaccionar etilen cetal de Androsta-5,7-dien-3 $\alpha$ -ol-17-ona (XII) (48 mg) con ácido p-toluensulfónico monohidrato (35 mg) en una mezcla de acetona (5 ml) y agua (0.2 ml) a temperatura ambiente durante la noche para dar androsta-5,7-dien-3 $\alpha$ -ol-17-ona (XIII) (43.4 mg). Se irradió Androsta-5,7-dien-3 $\alpha$ -ol-17-ona (XIII) (43.4 mg) bajo una lámpara de mercurio de 450 w con un filtro VYCOR® (Ace Glass Incorporated, Vineland, NJ) en éter (1100 ml) a -20 a 0 °C durante 5 minutos para dar pre-HMCHEMOIO, que se sometió a reflujo en etanol (15 ml) durante 3 horas para producir HMCHEMOIO (VII) (13.5 mg).

25 El HMCHEMOIO (VII) (13.5 mg) anterior se hizo reaccionar con hemihidrocloruro de O-(carboximetil)hidroxilamina (12 mg) y acetato de sodio (24 mg) en 1 ml de metanol durante toda la noche a temperatura ambiente para dar HMCHEMOIO-CMO (13.2 mg) (compuesto de la Fórmula XX en la Fig. 3 donde n = 1).

30 La BSA cationizada se preparó de la siguiente manera: se añadió trietilentetraamina (0.5 ml) (compuesto de la Fórmula XXI en la Fig. 3 donde cada r = 1 y s = 1) a 4.5 ml de regulador MES 50 mM pH 6, y el pH se ajustó a 6 seguido de la adición de 20 mg de BSA. La combinación se mezcló para disolver completamente los componentes. Se añadió EDAC (5 mg) a la solución anterior cada hora durante 5 horas. La solución se lavó en una celda de 10 ml de AMICON® (Amicon Inc., Beverly MA) con 10 x 10 ml de regulador de lavado (fosfato 10 mM + NaCl 300 mM) a pH 7. Luego, se agregaron 100 mg de TWEEN®20 a un matraz de fondo redondo de 50 ml. Se añadió regulador de lavado (50 ml) y la mezcla se agitó durante 10 minutos para dispersar Tween 20. El BSA cationizado (compuesto de la Fórmula XXIa en la Fig. 3 donde cada r = 1 y s = 2) se almacenó en regulador de lavado con TWEEN® 20 al 0.2% a aproximadamente 5 mg/ml.

40 Para la preparación de HMCHEMOIO-CMO BSA (compuesto de la Fórmula IIa en la Fig. 3), se colocaron EDAC (25 mg) y 10 mg de NHS en un matraz de 10 ml con 13.2 mg de HMCHEMOIO-CMO (XX) preparado como se describe anteriormente. Se añadió DMF (0.5 ml) al matraz. La mezcla se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente para dar HMCHEMOIO-CMO activado. La solución fue clara. El TLC (acetato de etilo 1:1: metanol) indicó que no quedaba material de partida.

45 La HMCHEMOIO-CMO activada de más arriba se añadió gota a gota a la solución de BSA cationizada de arriba, y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla se transfirió a una célula Amicon® (Amicon Inc., Beverly MA) y luego se lavó con 5 x 10 ml de regulador de lavado y se concentró (30,000 cortes) hasta aproximadamente 4 ml. La mezcla se separó adicionalmente en una columna SD-25 (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburg PA) usando un regulador de lavado de pH 7.0 como eluyente para dar una mezcla de compuestos HMCHEMOIO-CMO BSA (mezcla como se discutió anteriormente con respecto a los compuestos del Fórmula IIa en la Fig. 3).

### Ejemplo 2

Preparación de anticuerpos

50 Se inmunizó la cepa AJ de ratones (hembras, de al menos ocho semanas de edad) para generar anticuerpos monoclonales. La primera inmunización fue de 100  $\mu$ g de inmunógeno (HMCHEMOIO-CMO BSA) de más arriba en un volumen de 100  $\mu$ l con adyuvante completo de Freund (de Sigma-Aldrich, Cat # F5881). Tres semanas después, se administró una inmunización de refuerzo con el mismo inmunógeno con 100  $\mu$ g en un volumen de 100  $\mu$ l con

adyuvante de Freund incompleto (de Sigma-Aldrich Cat # F5506). Subsecuentemente, después de otras 3 semanas, se administró una segunda inmunización de refuerzo con el mismo inmunógeno con 100 µg en un volumen de 100 µl con adyuvante de Freund incompleto. Una semana después de la última inmunización de refuerzo, los ratones se sangraron y los sueros se probaron en ELISA para detectar anticuerpos anti-3-epímero. Subsecuentemente, se administró un refuerzo de prefusión en tres días consecutivos antes de la fusión con el mismo inmunógeno (20 µg en un volumen de 50 µl en PBS sin ningún adyuvante. En el cuarto día, se sacrificaron los ratones y se realizó la esplenectomía. Se extrajeron las células del bazo y la fusión se realizó mediante métodos estándar utilizando una línea celular de mieloma murino no secretora designada P3-X63Ag8.653 (ATCC CRL-1580™). La clonación se realizó mediante métodos estándar.

Los clones se seleccionaron mediante ELISA de unión e inhibición. El siguiente procedimiento de inmunoensayo ELISA de unión de acuerdo con el siguiente protocolo. Las placas se recubrieron con 3-epímero-conjugado con ovoalbúmina preparado de una manera similar a la descrita anteriormente para el conjugado BSA a 1 µg/ml en PBS a 50 µl por pozo. El recubrimiento de la placa se realizó durante 1 hora o más a temperatura ambiente. A continuación, las placas se secaron rápidamente y se bloquearon con 200 µl por pozo de diluyente de regulador de bloqueo (solución de caseína al 0.5% en PBS que contenía TWEEN® 20 al 0.05%). El bloqueo de la placa se realizó durante 1 hora o toda la noche a 2 °C-8 °C. Las placas se lavaron tres veces y se secaron rápidamente. El anticuerpo monoclonal que se va a examinar se añadió luego a cada pozo como sigue: 25 µl de PBS mezclado con 25 µl de sobrenadante de cultivo transferido desde el pozo correspondiente en la placa de crecimiento de fusión. La incubación se realizó durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente con agitación de la placa. La placa se lavó utilizando un lavador de placas (BioTek, Winooski VT) con un apilador de placas, siendo el regulador de lavado el agua MILLI-Q® (Millipore Corporation, Billerica, MA) que contenía TWEEN® 20 al 0.05%. Se añadió un conjugado enzimático (IgG anti-ratón de cabra) acoplado a HRP diluido en diluyente de regulador de bloqueo a 1:3000 a 50 µl por pozo. La incubación se realizó durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Luego se lavó la placa y una solución cromogénica (TMB de Moss Substrates, Pasadena MD) se añadió a un volumen de 100 µl por pozo durante diez minutos a temperatura ambiente. Las placas se leyeron a 650 nm utilizando un lector de placas ELISA.

Sobre la base de la técnica de selección anterior, se seleccionaron hibridomas que producen anticuerpos monoclonales adecuados. Uno de tales anticuerpos monoclonales fue designado anticuerpo 8F10 y es un anticuerpo kappa IgG2a. Otro anticuerpo monoclonal de este tipo fue designado anticuerpo 4G8 y es un anticuerpo kappa IgG2a.

Además, los clones también se seleccionaron utilizando un procedimiento ELISA de inhibición de acuerdo con el siguiente protocolo. Las placas se recubrieron con 3-epímero-conjugado con ovoalbúmina a 1 µg/ml en solución salina regulada con fosfato a 50 µl por pozo. El recubrimiento de la placa se realizó durante 1 hora o más a temperatura ambiente o durante la noche a aproximadamente 2 °C a 8 °C. A continuación, las placas se secaron rápidamente y se bloquearon con 200 µl por pozo de diluyente de regulador de bloqueo (solución de caseína al 0.5% en PBS que contenía TWEEN® 20 al 0.05%). El bloqueo de la placa se realizó por incubación durante 30 minutos o más a temperatura ambiente con agitación de la placa. Las placas se lavaron. El anticuerpo monoclonal que se va a examinar se agregó entonces a cada pozo junto con el 3-epímero libre de la siguiente manera: 25 µl por sobrenadante de cultivo del pozo transferido desde el pozo correspondiente en la placa de crecimiento de fusión y se agregaron 25 µl de 2 µg/ml de 3-epímero-25OH Vitamina D<sub>3</sub>. La incubación se realizó durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente con agitación de la placa. La placa se lavó utilizando un lavador de placas (BioTek, Winooski VT) con un apilador de placas, siendo el regulador de lavado el agua MILLI-Q® (Millipore Corporation, Billerica, MA) que contenía TWEEN® 20 al 0.05%. Se añadió un conjugado enzimático (IgG anti-ratón de cabra) acoplado a HRP diluido en diluyente de regulador de bloqueo a 1:3000 a 50 µl por pozo. La incubación se realizó durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Luego se lavó la placa y se agregó una solución cromogénica (TMB de Moss Substrates, Pasadena MD) a un volumen de 100 µl por pozo. Si estaba presente un anticuerpo deseado en el sobrenadante del hibridoma, se observó una disminución en la densidad óptica en comparación con el pozo que no contenía 3-epímeros libres. Se usó 25 OH Vitamina D<sub>3</sub> en lugar de 3-epímero-25 OH Vitamina D<sub>3</sub> como control para monitorizar la especificidad de los anticuerpos. Se seleccionaron los anticuerpos que se unen al 3-epímero y no se unen a 25OH vitamina D<sub>3</sub>.

Generación de anticuerpos policlonales: los conejos se inmunizaron con 500 µg/dosis de HMCHEMOIO-CMO BSA preparado como se describe anteriormente. Se realizaron una inmunización primaria y cinco inmunizaciones de refuerzo con dos semanas de diferencia, se recogieron dos sangrados de prueba y un sangrado de producción y se analizaron los sueros en ELISA como se describió anteriormente.

### Ejemplo 3

Inmunoensayo para 25OH vitamina D

Procedimiento de Inmunoensayo

El formato de inmunoensayo de 25OH Vitamina D (25(OH)D) empleado fue un inmunoensayo quimioluminiscente competitivo homogéneo basado en la tecnología de ensayo LOCI®. El ensayo se realizó en el sistema integrado de química clínica integrada Siemens Dimension® EXL (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, IL). El ensayo midió la concentración total de 25(OH)D<sub>2</sub> y/o 25(OH)D<sub>3</sub> en muestras de suero y plasma. Los reactivos de ensayo

LOCI® incluyeron un reactivo de liberación, dos reactivos de perlas sintéticas y un reactivo de anticuerpo monoclonal biotinilado anti-25OH vitamina D. El primer reactivo de perlas (denominado "Sensibeads") se recubrió con estreptavidina y contenía un colorante fotosensible. El segundo reactivo de perlas (denominado "Chemibeads") se recubrió con un análogo de 25(OH)D<sub>3</sub> y contenía un colorante quimioluminiscente. La muestra se incubó con el reactivo de liberación para liberar moléculas de 25(OH)D que incluyen compuestos 3-epiméricos de proteínas de unión a la vitamina D. La mezcla de reacción se incubó luego con anticuerpo biotinilado para formar un complejo de anticuerpo biotinilado 25(OH)D. Debido a que el anticuerpo biotinilado (un anticuerpo monoclonal de oveja) reaccionó de manera cruzada con 3-epi-25(OH)D, se agregaron 100 µg/ml de anticuerpo anti-3-epímero-VD 8F10.1 para minimizar la señal de ensayo proveniente de los compuestos de 3-epímero vitamina D. Se añadieron Chemibeads para unir el exceso de anticuerpo biotinilado libre. A continuación, se agregaron Sensibeads para unirse a la porción de biotina del anticuerpo biotinilado. Como resultado se formaron agregados de Chemibead análogo/anticuerpo-biotina/estreptavidina-Sensibeads. La iluminación de la mezcla de reacción con luz a 680 nm genera oxígeno singlete de Sensibeads, que se difunde en Chemibeads y desencadena una reacción de quimioluminiscencia. La señal quimioluminiscente resultante se midió a 612 nm y es inversamente proporcional a la concentración total de 25(OH)D en la muestra.

Preparación de reactivos para inmunoensayo.

Síntesis de 25(OH)D<sub>3</sub> Chemibeads - Las de 25(OH)D<sub>3</sub> Chemibeads se sintetizaron mediante el acoplamiento de EPRM-EDA con 25(OH)D<sub>3</sub> carbamato. Los materiales empleados fueron perlas EPRM-EDA, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) fluka sulfo-N-hidroxisuccinimida (SNHS), 25(OH)D<sub>3</sub>-3-carbamato, solución surfactante GAFAC® al 16 %, DMSO anhidro, MES 50 mM pH6 que contenía 10% de MeOP y 1% de surfactante GAFAC®.

Preparación de perlas de EPRM-EDA: se agregan perlas de EPRM (2000 mg, 20.0 ml) a un vial de 40 ml. Las perlas de EPRM se preparan mediante un procedimiento similar al descrito en la patente U.S. No. 7,179,660 y el compuesto quimioluminiscente es 2-(4-(N,N,di-tetradecil)-anilino-3-fenil tioxeno con quelato de europio. EDA (800 mg, 890 µl) se combina con 10 ml de regulador MES pH 6 (el "Regulador") y aproximadamente 4.2 ml de HCl 6N. El pH de la mezcla es, o se ajusta para que sea, de aproximadamente 6.9. La solución de EDA se agrega a las perlas de EPRM con agitación de vórtex y la mezcla se agitan a temperatura ambiente durante 15 minutos. El cianoborohidruro de sodio (400 mg) se combina en un vial de 15 ml con 10 ml de agua DI y la combinación se agrega a la mezcla de perlas de arriba. La mezcla se agita a 37 °C durante 18-20 horas. Las perlas se transfirieron a seis tubos de centrifuga de 40 ml. Se agregó regulador MES para llevar el volumen a 35 ml y la mezcla se centrifugó a 19,000 rpm durante 30 minutos. Se decantó el sobrenadante y las perlas se resuspenden en 2 ml del Regulador con una barra de agitación y se agrega Regulador adicional a 35 ml. La mezcla se somete a sonicación a 18 vatios de potencia durante 30 segundos, utilizando hielo para mantener la mezcla fría. La etapa de lavado/sonicación se realiza 4 veces para eliminar todo el producto químico de activación. Después de la última centrifugación del Regulador MES, se añaden 2 ml del Regulador que contenía MeOP al 5% y Tween® 20 al 0.1% (el "segundo Regulador") a los tubos para la etapa de re-suspensión. Se agrega un segundo Regulador adicional a 35 ml antes de la sonicación. La suspensión de perlas se centrifuga a 19,000 rpm durante 30 min. El sobrenadante se desecha. La sonicación final usó 12 ml del segundo Regulador en cada tubo para obtener una dilución de 25 mg/ml. El tamaño de partícula es de 277 nm, como se determina en un instrumento UPA.

La Chemibead de EPRM se prepara de una manera similar al método descrito en la Patente U.S. Nº 6,153,442 y en la Publicación de Solicitud de Patente U.S. Nº 20050118727A. La Chemibead de EPRM comprende una capa interna de aminodextrano y una capa externa de aldehído de dextrano que tiene funcionalidades de aldehído libre. Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. Nos. 5,929,049, 7,179,660 y 7,172,906. La reacción se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 0 a aproximadamente 40 °C durante un período de aproximadamente 16 a aproximadamente 64 horas a un pH de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 7.0, o aproximadamente 6, en un medio acuoso regulado que emplea un regulador adecuado tal como como, por ejemplo, MES. La reacción se inactiva mediante la adición de un agente de inactivación adecuado tal como, por ejemplo, hemihidrocloruro de carboximetoxilamina (CMO), y el subsecuente lavado de las partículas.

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

Síntesis de 25(OH)D<sub>3</sub>-3-carbamato (25(OH)D<sub>3</sub>-3-carbamato) - una mezcla de 22 mg (55 µmol) 25(OH)D<sub>3</sub> adquirida de ChemReagents.com, Sugarland TX, 100 mg (420 µmol) disuccinimidil carbonato (DSC), 100 µl de trietilamina en 1 ml de acetonitrilo anhidro en un matraz de 5 ml (cubierto con papel de aluminio) se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas bajo nitrógeno para preparar 25(OH)D<sub>3</sub> activado. La TLC (EtOAc: hexano = 2: 1) no mostró material de partida. Se preparó una suspensión añadiendo 150 mg de hemihidrocloruro de carboximetoxilamina (CMO), 0.3 ml de trietilamina y 1 ml de DMF a un matraz de 10 ml. Se añadió gota a gota una solución que contenía 25(OH)D<sub>3</sub> activado a la suspensión de CMO con agitación, que se continuó durante otras 18 h. Se aplicó vacío para eliminar los

5 disolventes lo más posible (manteniendo la temperatura del baño de calentamiento por debajo de 50 °C). Se añadió EtOAc (25 ml) al residuo, que se lavó tres veces con 2 ml de salmuera. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se filtró; El disolvente se eliminó utilizando un rotavapor. El producto crudo (42 mg) se obtuvo después del secado y se purificó por HPLC. Se obtuvo producto puro (24 mg) después de secar bajo alto vacío. El producto se disolvió en 1.2 ml de DMSO anhidro. Las alícuotas se transfirieron a viales, que se mantuvieron a -70 °C.

10 Acoplamiento de EPRM-EDA con el hapteno 25(OH)D<sub>3</sub>-Carbamato - se añadieron 1.2 mg de hapteno a un vial de 2 ml. Se agregaron 11.2 mg de EDAC y 15.5 mg de SNHS más 3.73 ml de DMSO seco a un vial de 5 ml. La solución de EDAC/SNHS se rotó para disolver los contenidos. Se agregaron 1.14 ml de solución de EDAC/SNHS al vial que contenía hapteno. La mezcla se hizo girar durante 22 horas. EPRM-EDA (200 mg) se lavó una vez con Regulador de lavado de alto pH y luego con regulador MES pH6. A un vial de 5 ml se agregaron 1.08 ml (100 mg) de regulador de lavado seguido de 143 ml de 1.6% de surfactante GAFAC®. A un pequeño tubo de ensayo se le agregaron 256 DMSO secos seguidos de 49 µl de EDAC/SNHS/hapteno. La solución de DMSO/hapteno se añadió gota a gota a la mezcla de perlas (se sometió a agitación con vórtex durante la adición). La mezcla de perla/hapteno se hizo girar durante la noche a temperatura ambiente.

15 La mezcla perla/hapteno se transfirió a un tubo de centrifuga de 50 ml y se diluyó a 35 ml con un 10% de 1-metoxi-2-propanol/1% de surfactante GAFAC®/MES pH 6. El tubo se centrifugó a 18,500 rpm a 10 °C durante 30 minutos. El sobrenadante se desechó y se reemplazó por 1 ml del mismo regulador. La pella se resuspendió con una barra de agitación. El vial se llenó a 35 ml con el mismo regulador. El tubo se sometió a sonicación a 18-21 vatios durante 1 minuto utilizando hielo para mantener el tubo frío. La centrifugación/lavado se repitió seis veces. Después del sexto lavado, el regulador se cambió a Regulador de lavado Hapten pH 7.2 y se realizaron dos lavados más. Después del último lavado y la resuspensión con 1 ml de regulador de lavado Hapten, se agregaron 4 ml de regulador de lavado Hapten. La mezcla de perlas se sometió a sonicación a una potencia del 50% en una taza sonicadora. El tamaño de partícula se midió por UPA como 298 nm. Se realizó un ensayo de porcentaje de sólidos y la mezcla de perlas se diluyó a 10 mg/ml. Este reactivo de Chemibead se formuló en un regulador MES 50 mM.

25 Biotinilación del anticuerpo anti-25(OH)D- NHS-PEO4-biotina (Pierce Chemical Company, Rockford IL) se acopló con el anticuerpo anti-25(OH)D (un anticuerpo monoclonal de oveja de Bioventix, Farnham, Surrey, Reino Unido) . 3 mg del anticuerpo anti-25(OH)D se intercambiaron en regulador dos veces con 10 ml cada uno de regulador de diálisis de anticuerpos (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7.0/NaCl 300 mM) en 10 ml de Amicon y luego se concentraron a 3.0 mg/ml. Se disolvió 1 mg de NHS-PEO4-biotina en 100 µl de Regulador de Diálisis de anticuerpos para obtener 10 mg/ml de la solución de reactivo de biotina, que se agregó (35 µl) a la solución de anticuerpo anti-25(OH)D. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se lavó tres veces con 10 ml de Amicon de Regulador de Diálisis de anticuerpos en 10 ml de Amicon, y luego se concentró hasta aproximadamente 1 ml. La concentración se midió en UV A280. El reactivo de anticuerpo anti-25(OH)D biotinilado se formuló en un regulador acuoso que contenía un regulador de ácido cítrico 25 mM, NaCl 300 mM, EDTA 1 mM, proteínas bloqueadoras y conservantes, pH 5.0.

30 Sensibeads: se prepararon perlas sensibilizadoras de estreptavidina utilizando un método análogo al descrito en las patentes U.S. Nos. 6,153,442, 7,022,529, 7,229,842 y la publicación de solicitud de patente U.S. No. 20050118727A. El fotosensibilizador fue bis-(trihexil)-silicio-t-butil-ftalocianina. La concentración de reactivo Sensibead fue de 200 µg/ml en regulador HEPES, pH 8.0 que contenía NaCl 150 mM.

40 Reactivo de liberación: salicilato de sodio en regulador HEPES 5 mM.

Resultados del inmunoensayo

45 El efecto de agregar el anticuerpo anti-3-epímero-VD 8F10.1 (anti-3-epímero VD Ab) sobre la reactividad cruzada del 3-epímero para el ensayo se muestra en la Tabla 1. Diez sueros de pacientes que contenían compuestos 25(OH)D<sub>2</sub> o 25(OH)D<sub>3</sub> se enriquecieron con 100 ng/ml de compuesto de 3 epímero de vitamina D<sub>3</sub> adquirido en Sigma (número de inventario 751324). La reactividad cruzada de 3-epímero se calculó mediante la diferencia entre los valores de 25(OH)D<sub>2</sub> o 25(OH)D<sub>3</sub> con y sin el compuesto de 3-epímero enriquecido dividido por la cantidad de compuesto de 3-epímero agregado. Con la adición de 100 µg/ml del anticuerpo anti-3-epímero-VD 8F10.1, la reactividad cruzada promedio de 3-epímero se redujo de 13.7% a menos de 2%.

Tabla 1

ID muestra	de 3-epimero enriquecido	D <sub>3</sub>	Sin anti-3-epímero VD Ab Añadido		anti-3-epímero VD Ab Añadido	
			ng/ml	Reactividad cruzada	ng/ml	Reactividad cruzada
1	No	30.2			30.7	

ES 2 731 254 T3

ID muestra	de 3-epímero enriquecido	D <sub>3</sub>	Sin anti-3-epímero VD Ab Añadido		anti-3-epímero VD Ab Añadido	
			ng/ml	Reactividad cruzada	ng/ml	Reactividad cruzada
	Sí		48.0	17.9%	33.0	2.2%
	No		22.5		23.2	
2	Sí		40.5	17.9%	25.6	2.4%
	No		19.8		20.7	
3	Sí		31.6	11.9%	22.5	1.8%
	No		40.4		40.5	
4	Sí		53.0	12.6%	41.4	1.0%
	No		46.6		45.6	
5	Sí		62.7	16.1%	49.2	3.5%
	No		47.3		48.5	
6	Sí		57.5	10.2%	46.4	-2.0%
	No		53.1		55.4	
7	Sí		62.2	9.1%	55.4	0.0%
	No		39.5		40.8	
8	Sí		50.0	10.5%	43.8	3.0%
	No		47.4		48.6	
9	Sí		62.8	15.3%	50.8	2.2%
	No		23.6		24.8	
10	Sí		39.1	15.5%	28.6	3.8%
Promedio de reactividad cruzada				13.7%		1.8%

5 La Fig. 9 ilustra una comparación de curvas estándar generadas usando reactivos con y sin agregado del anticuerpo anti-3-epímero-VD 8F10.1 (3-epímero Ab). La superposición completa de las dos curvas muestra que el anticuerpo anti-3-epímero-VD 8F10.1 no afecta la medición de 25(OH)D<sub>3</sub> (25OH Vit D<sub>3</sub> en la Fig. 9), lo que indica que el anticuerpo es específico para el compuesto 3-epímero y no tiene reactividad cruzada observable con el 25(OH)D<sub>3</sub>.

**Ejemplo 4**

Inmunoensayo para 3-epi-25OH vitamina D

Procedimiento de Inmunoensayo



La medición de 3-epi-25OH Vitamin D (3-epi-25(OH)D) empleó un inmunoensayo quimioluminiscente competitivo homogéneo basado en la tecnología de ensayo LOCI® similar a la descrita anteriormente en el Ejemplo 3. El ensayo se realizó en sistema automatizado de química clínica integrado Siemens Dimension® EXL (Siemens Healthcare Diagnostics Inc). Los reactivos del ensayo LOCI® utilizados para la medición de 3-epi-25(OH)D incluyeron un reactivo de liberación, dos reactivos de perlas sintéticas y un reactivo de anticuerpo monoclonal biotinilado anti-3-epímero. El primer reactivo de perlas (Sensibeads) se recubrió con estreptavidina y contenía un colorante fotosensible. El segundo reactivo de perlas (Chemibeads) se recubrió con un análogo de 3-epímero (compuesto de la Fórmula IIa anterior en donde Z' es un marcador no poli(aminoácido), a saber, Chemibead EPRM-EDA) preparado de una manera similar a la descrita anteriormente para el Ejemplo 1. La muestra se incubó con el reactivo de liberación para liberar moléculas de 25(OH)D que incluyen compuestos 3-epiméricos de proteínas de unión a la vitamina D. La mezcla de reacción se incubó luego con un anticuerpo biotinilado para formar un complejo 3-epi-25(OH)D/anticuerpo biotinilado. Se añadieron Chemibeads para eliminar el exceso de anticuerpo biotinilado libre. A continuación, se agregan Sensibeads y se unen a la porción de biotina del anticuerpo biotinilado. Como resultado se formaron agregados de Chemibead-análogo/anticuerpo-biotina/estreptavidina-Sensibeads. La iluminación de la mezcla de reacción por luz a 680 nm generó oxígeno singlete de las Sensibeads, que se difundió en las Chemibeads y provocó una reacción quimioluminiscente. La señal quimioluminiscente resultante se mide a 612 nm y es inversamente proporcional a la concentración de 3-epi-25 (OH)D total en la muestra.

Preparación de reactivos para inmunoensayo.

Síntesis de Chemibeads análogos de 3-epímero: se prepararon Chemibeads para uso en este ensayo para la detección de 3-epi-25 (OH)D de una manera similar a la descrita anteriormente en el Ejemplo 3 para la síntesis de Chemibeads de 25(OH)D<sub>3</sub> con el hapteno siendo un compuesto de la Fórmula IIa donde Z' es el Chemibead.

Reactivo de Chemibead: análogo de 3 epímero de Chemibeads en un regulador MES 50 nM.

Biotinilación del anticuerpo anti-3-epímero-VD 8F10.1 - La biotinilación del anticuerpo anti-3-epímero-VD 8F10.1 se llevó a cabo de manera similar a la descrita anteriormente en el Ejemplo 3 para la biotinilación del anticuerpo anti-25(OH)D.

Reactivo de anticuerpo biotinilado: anticuerpo anti-3-epímero-VD biotinilado 8F10.1 indicado anteriormente en un regulador cítrico 25 mM.

Reactivo Sensibead: el reactivo Sensibead fue el mismo que en el Ejemplo 3.

Resultados del inmunoensayo

La Fig. 10 ilustra una curva estándar para el inmunoensayo para la determinación de 3-epi-25(OH)D en muestras que usan el anticuerpo anti-3-epímero-VD 8F10.1. Los quiloconteos quimioluminiscentes representan la señal quimioluminiscente medida como se describió anteriormente.

Debe entenderse que los ejemplos descritos anteriormente son meramente ilustrativos de algunos de los muchos ejemplos específicos que representan los principios descritos en este documento. Claramente, los expertos en la técnica pueden idear fácilmente otras numerosas disposiciones sin apartarse del alcance como se define en las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para determinar una cantidad de un analito epimérico de vitamina D en una muestra que se sospecha que contiene el analito epimérico de vitamina D, comprendiendo el método:

(a) Proporcionar en combinación en un medio de ensayo:

5 (i) la muestra, y

(ii) un asociado de unión al epímero de vitamina D que es específico para el analito epimérico de vitamina D;

en donde el asociado de unión es un anticuerpo o un aptámero, (b) incubar el medio de ensayo bajo condiciones para la unión del asociado de unión del epímero de vitamina D al analito epimérico de vitamina D; y

10 (c) determinar la cantidad de complejo unido a la unión de la vitamina D epímero y relacionar la cantidad del complejo asociado a la unión de la vitamina D epímero a la cantidad del analito epimérico de vitamina D en la muestra,

en donde el analito epimérico de vitamina D es 3-epi-25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> o 3-epi-25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>.

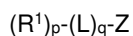
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el asociado de unión al epímero de vitamina D comprende un miembro de un sistema de producción de señales o un soporte sólido.

15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el asociado de unión a la vitamina D comprende un miembro de un sistema de producción de señales que es un marcador.

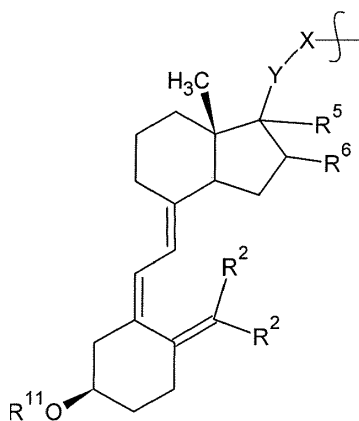
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la combinación comprende además un análogo de vitamina D en donde el análogo de vitamina D comprende un miembro de un sistema de producción de señales.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el miembro de un sistema de producción de señales es un marcador.

20 6. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el análogo de vitamina D es un compuesto de la fórmula:



en donde R<sup>1</sup> =



o H, en donde al menos uno de R<sup>1</sup> no es H,

25 Y es O, S, CR, o NR<sup>4</sup>,

X es -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>-C(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-C(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>w</sub>-C(O)-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>-C(O)-, o -NR<sup>3</sup>-C(O)-,

R es independientemente H o alquilo,

R<sup>2</sup> es independientemente H o alquilo,

30 R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> son independientemente H o alquilo, o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se pueden tomar juntos para formar un enlace, o R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> se pueden tomar juntos para formar un enlace, o R y R<sup>5</sup> se pueden tomar juntos para formar un enlace,

R<sup>11</sup> es H, alquilo, o acilo,

n es un entero de 0 a 10,

w es un entero de 1 a 10,

x es un entero de 1 a 10,

y es un entero de 1 a 10,

p es un entero de 1 a 10,

5 L es un grupo enlazante,

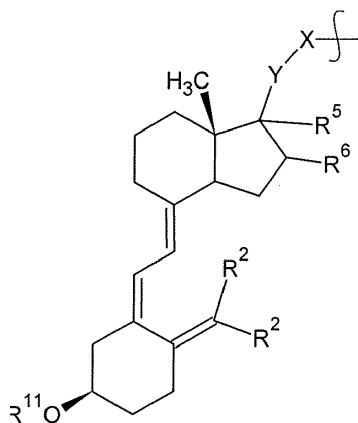
q es 0 o 1, y

Z es un marcador.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el asociado de unión al epímero de vitamina D se genera contra un compuesto de la fórmula:

10  $(R^1)_p-(L)_q-Z$

en donde  $R^1 =$



o H, en donde al menos uno de  $R^1$  no es H,

Y es O, S, CR, o  $NR^4$ ,

15 X es  $-O-(CH_2)_n-C(O)-$ ,  $-(CH_2)_w-C(O)-$ ,  $-(CH_2)_w-C(O)-(CH_2)_x-C(O)-$ ,  $-(CH_2)_w-C(O)-NH(CH_2)_y-C(O)-$ , o  $-NR^3-C(O)-$ ,

R es independientemente H o alquilo,

$R^2$  es independientemente H o alquilo,

$R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  y  $R^6$  son independientemente H o alquilo, o  $R^4$  y  $R^5$  se pueden tomar juntos para formar un enlace, o  $R^5$  y  $R^6$  se pueden tomar juntos para formar un enlace, o R y  $R^5$  se pueden tomar juntos para formar un enlace,

20  $R^{11}$  es H, alquilo, o acilo,

n es un entero de 0 a 10,

w es un entero de 1 a 10,

x es un entero de 1 a 10,

y es un entero de 1 a 10,

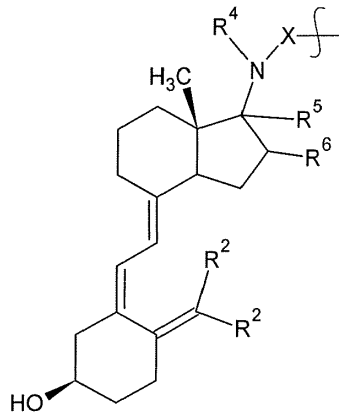
25 p es un entero de 1 a 10,

L es un grupo enlazante,

q es 0 o 1, y

Z es un portador inmunogénico; y que incluye mezclas de dos o más de los compuestos.

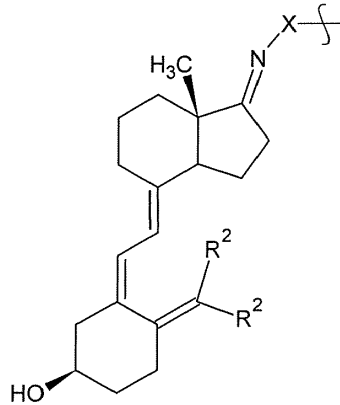
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde en el compuesto  $R^1 =$



o H,

en donde al menos uno de R<sup>1</sup> no es H; o

en donde en el compuesto R<sup>1</sup> =



5

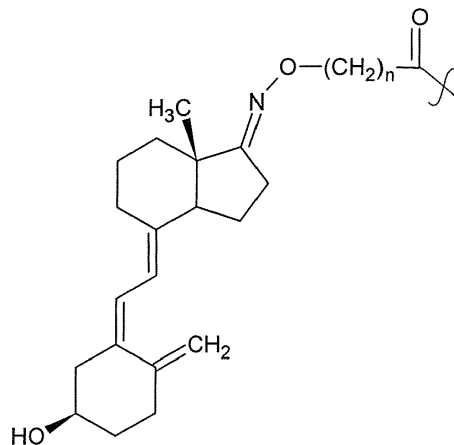
o H, en donde al menos uno de R<sup>1</sup> no es H.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde en el compuesto



en donde

10 R<sup>1</sup> es independientemente



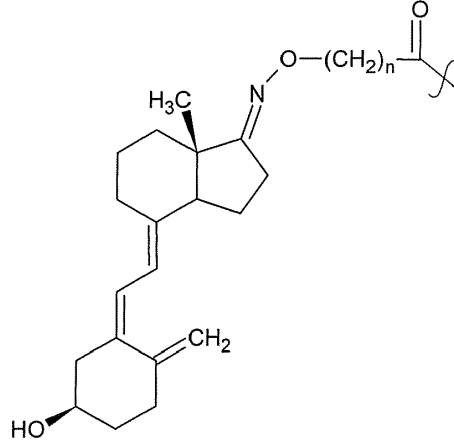
o H, en donde al menos uno de R<sup>1</sup> no es H,

r es independientemente un entero de 1 a 10,

s es un entero de 1 a 10, y

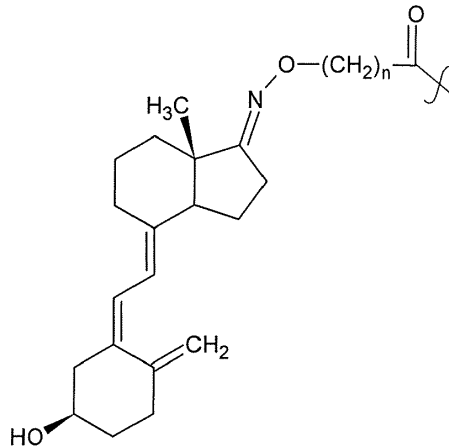
R<sup>7</sup> es H o alquilo.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde en el compuesto r es 2, s es 1, R<sup>7</sup> es H, y un R<sup>1</sup> es



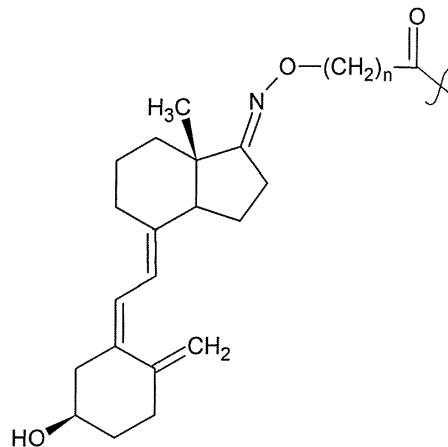
5 o

en donde en el compuesto r es 2, s es 1, R<sup>7</sup> es H, y dos R<sup>1</sup> son



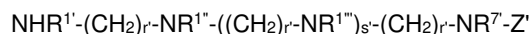
o

en donde en el compuesto r es 2, s es 1, R<sup>7</sup> es H, y tres R<sup>1</sup> son



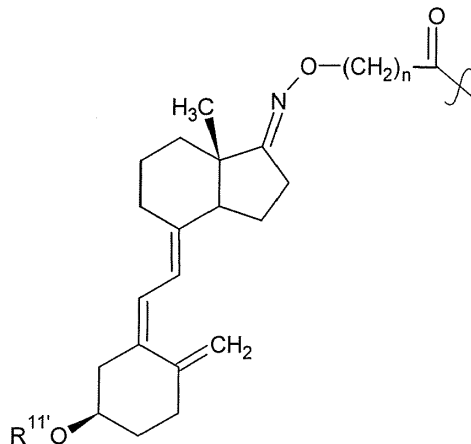
10

11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el asociado de unión al epímero de vitamina D se genera contra un compuesto de la fórmula:



en donde

$R^{1'}$ ,  $R^{1''}$  o  $R^{1'''}$  se seleccionan cada uno independientemente de



5 y H,

en donde

al menos uno de  $R^{1'}$ ,  $R^{1''}$  o  $R^{1'''}$  no es H,

$n'$  es un entero de 1 a 10,

$r'$  es independientemente un entero de 1 a 10,

10  $s'$  es un entero de 1 a 10,

$R^{7'}$  es H o alquilo,

$R^{11'}$  es H, alquilo, o acilo, y

$Z'$  es un portador inmunogénico de poli(aminoácido) o un portador inmunogénico no de poli(aminoácido); y que incluye mezclas de dos o más de los compuestos.

15 12. Un método para determinar una cantidad de un analito epimérico de vitamina D en una muestra que se sospecha que contiene el analito epimérico de vitamina D, comprendiendo el método:

(a) Proporcionar en combinación en un medio de ensayo:

(i) la muestra, y

20 (ii) un anticuerpo de captura que es un anticuerpo epímero de vitamina D que es específico para epímeros del analito de vitamina D;

(b) incubar el medio de ensayo bajo condiciones para la unión del anticuerpo de captura al analito epimérico de vitamina D para formar un complejo unido a anticuerpo epimérico de vitamina D;

25 (c) combinar el complejo unido a anticuerpo epimérico de vitamina D con un anticuerpo de detección que se une al analito epimérico de vitamina D en el complejo unido a anticuerpo de vitamina D en donde el anticuerpo de detección comprende un miembro de un sistema de producción de señales, y

(d) medir una señal producida por el sistema de producción de señales y relacionar la cantidad de la señal con la cantidad del analito epimérico de vitamina D en la muestra,

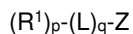
en donde el analito epimérico de vitamina D es 3-epi-25-hidroxitamina  $D_2$  o 3-epi-25-hidroxitamina  $D_3$ ,

30 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde comprende además separar el complejo unido al anticuerpo del medio.

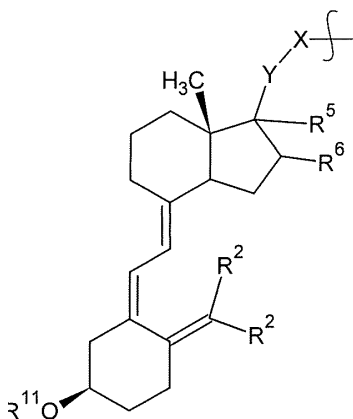
14. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el anticuerpo de captura comprende un soporte sólido.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el anticuerpo de captura comprende una partícula en donde la partícula es una partícula magnética o la partícula comprende uno de un fotosensibilizador o un compuesto quimioluminiscente.

5 16. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el anticuerpo epímero de vitamina D se genera contra un compuesto de la fórmula:



en donde  $R^1 =$



o H, en donde al menos uno de  $R^1$  no es H,

10 Y es O, S, CR, o  $NR^4$ ,

X es  $-O-(CH_2)_n-C(O)-$ ,  $-(CH_2)_w-C(O)-$ ,  $-(CH_2)_w-C(O)-(CH_2)_x-C(O)-$ ,  $-(CH_2)_w-C(O)-NH(CH_2)_y-C(O)-$ , o  $-NR^3-C(O)-$ ,

R es independientemente H o alquilo,

$R^2$  es independientemente H o alquilo,

15  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  y  $R^6$  son independientemente H o alquilo, o  $R^4$  y  $R^5$  se pueden tomar juntos para formar un enlace, o  $R^5$  y  $R^6$  se pueden tomar juntos para formar un enlace, o R y  $R^5$  se pueden tomar juntos para formar un enlace,

$R^{11}$  es H, alquilo, o acilo,

n es un entero de 0 a 10,

w es un entero de 1 a 10,

x es un entero de 1 a 10,

20 y es un entero de 1 a 10,

p es un entero de 1 a 10,

L es un grupo enlazante,

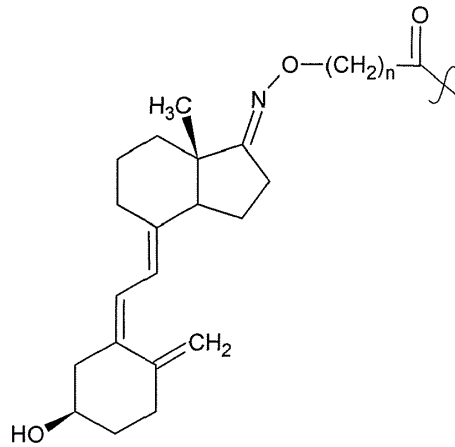
q es 0 o 1, y

Z es un portador inmunogénico; y que incluye mezclas de dos o más de los compuestos.

25 17. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde en el compuesto



en donde  $R^1$  es independientemente



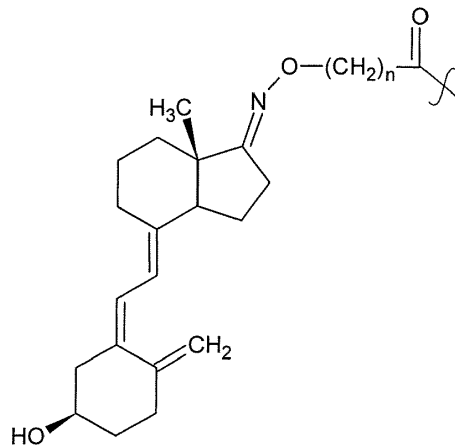
o H, en donde al menos uno de R<sup>1</sup> no es H,

r es independientemente un entero de 1 a 10,

s es un entero de 1 a 10, y

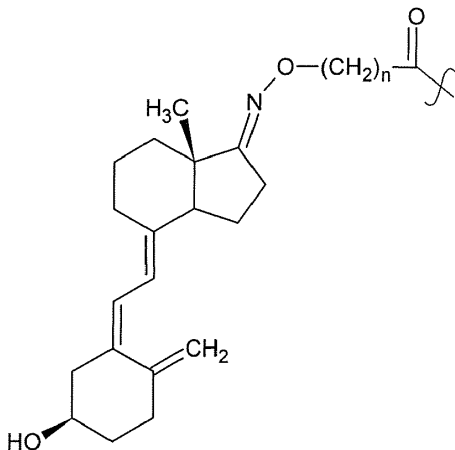
5 R<sup>7</sup> es H o alquilo.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde en el compuesto r es 2, s es 1, R<sup>7</sup> es H, y un R<sup>1</sup> es



o

en donde en el compuesto r es 2, s es 1, R<sup>7</sup> es H, y dos R<sup>1</sup> son

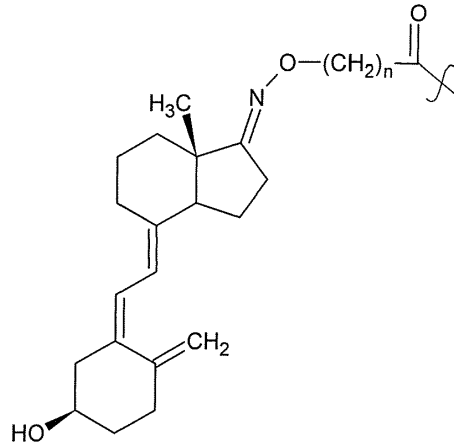


10

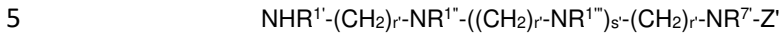
o



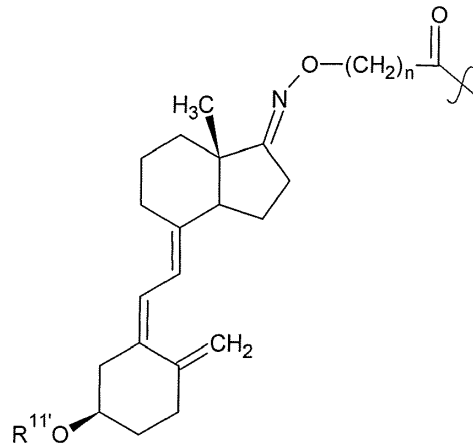
en donde en el compuesto r es 2, s es 1, R<sup>7</sup> es H, y tres R<sup>1</sup> son



19. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el anticuerpo epímero de vitamina D se genera contra un compuesto de la fórmula:



en donde R<sup>1'</sup>, R<sup>1''</sup> o R<sup>1'''</sup> se seleccionan cada uno independientemente de



y H, y

en donde al menos uno de R<sup>1'</sup>, R<sup>1''</sup> o R<sup>1'''</sup> no es H,

10 n' es un entero de 1 a 10,

r' es independientemente un entero de 1 a 10,

s' es un entero de 1 a 10,

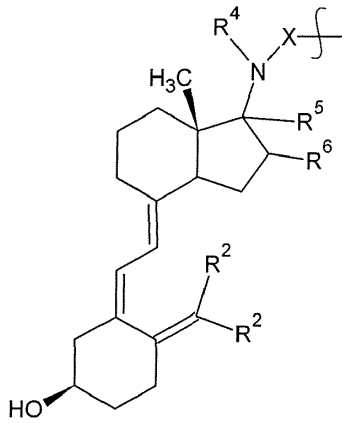
R<sup>7'</sup> es H o alquilo,

R<sup>11'</sup> es H, alquilo, o acilo, y

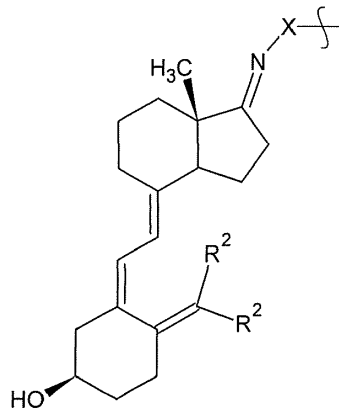
15 Z' es un portador inmunogénico de poli(aminoácido) o un portador inmunogénico no poli(aminoácido).

20. El método de acuerdo con la reivindicación 12,

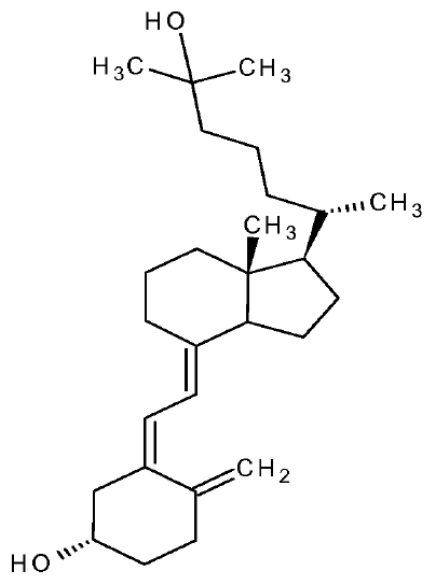
en donde en el compuesto R<sup>1</sup> =



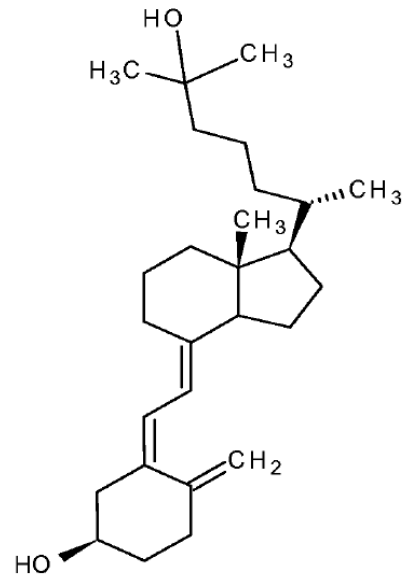
o H, en donde al menos uno de R<sup>1</sup> no es H; o  
 en donde en el compuesto R<sup>1</sup> =



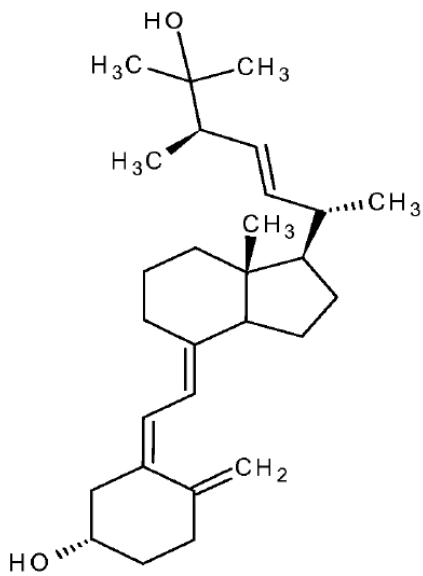
5 o H, en donde al menos uno de R<sup>1</sup> no es H.



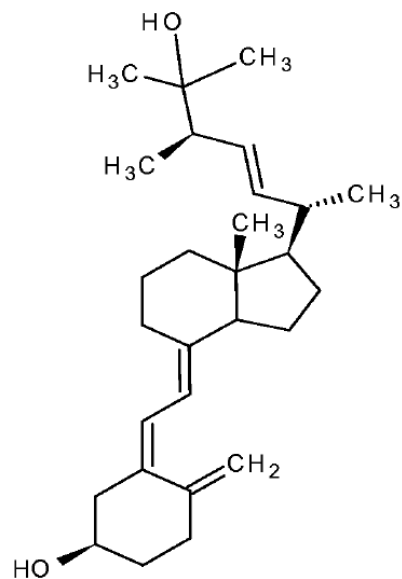
25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>



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

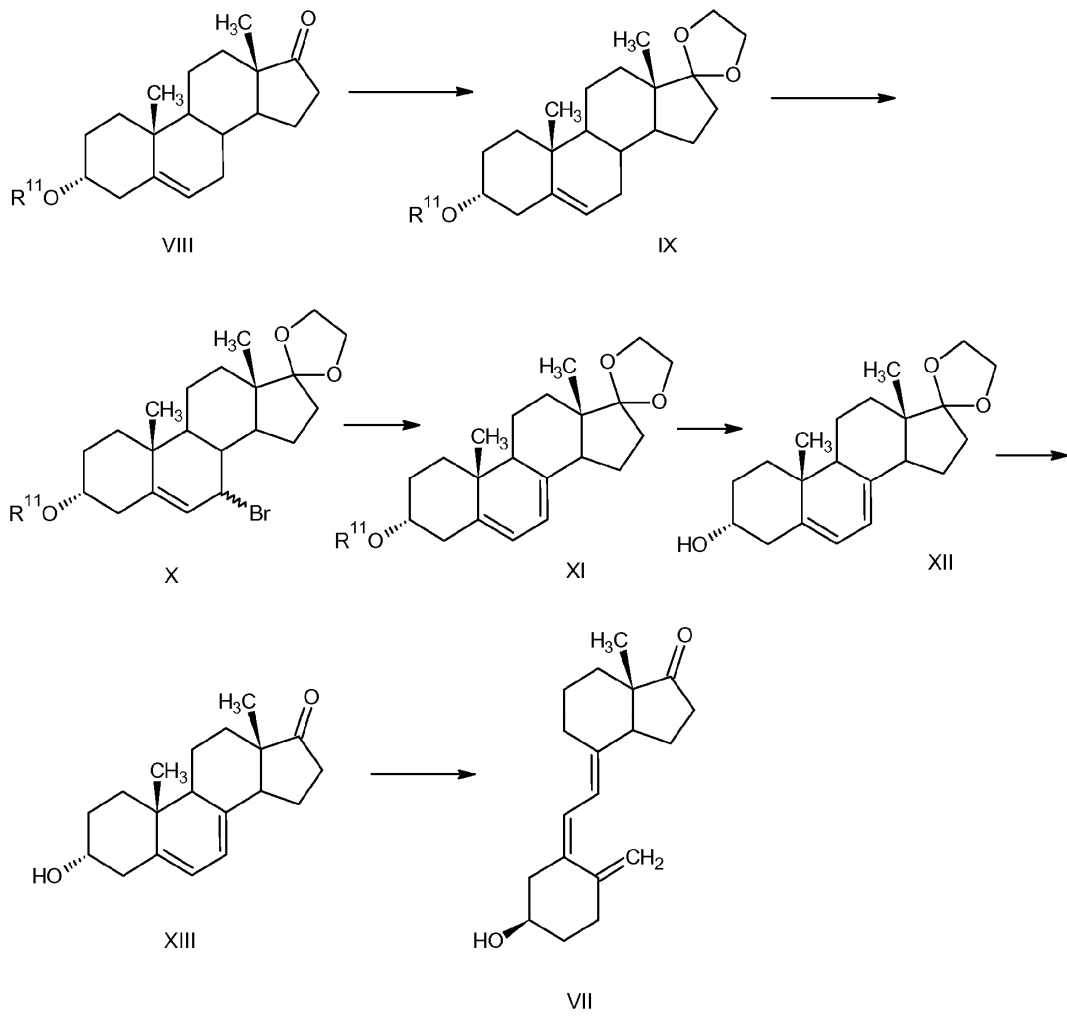


25-hidroxivitamina D<sub>2</sub>

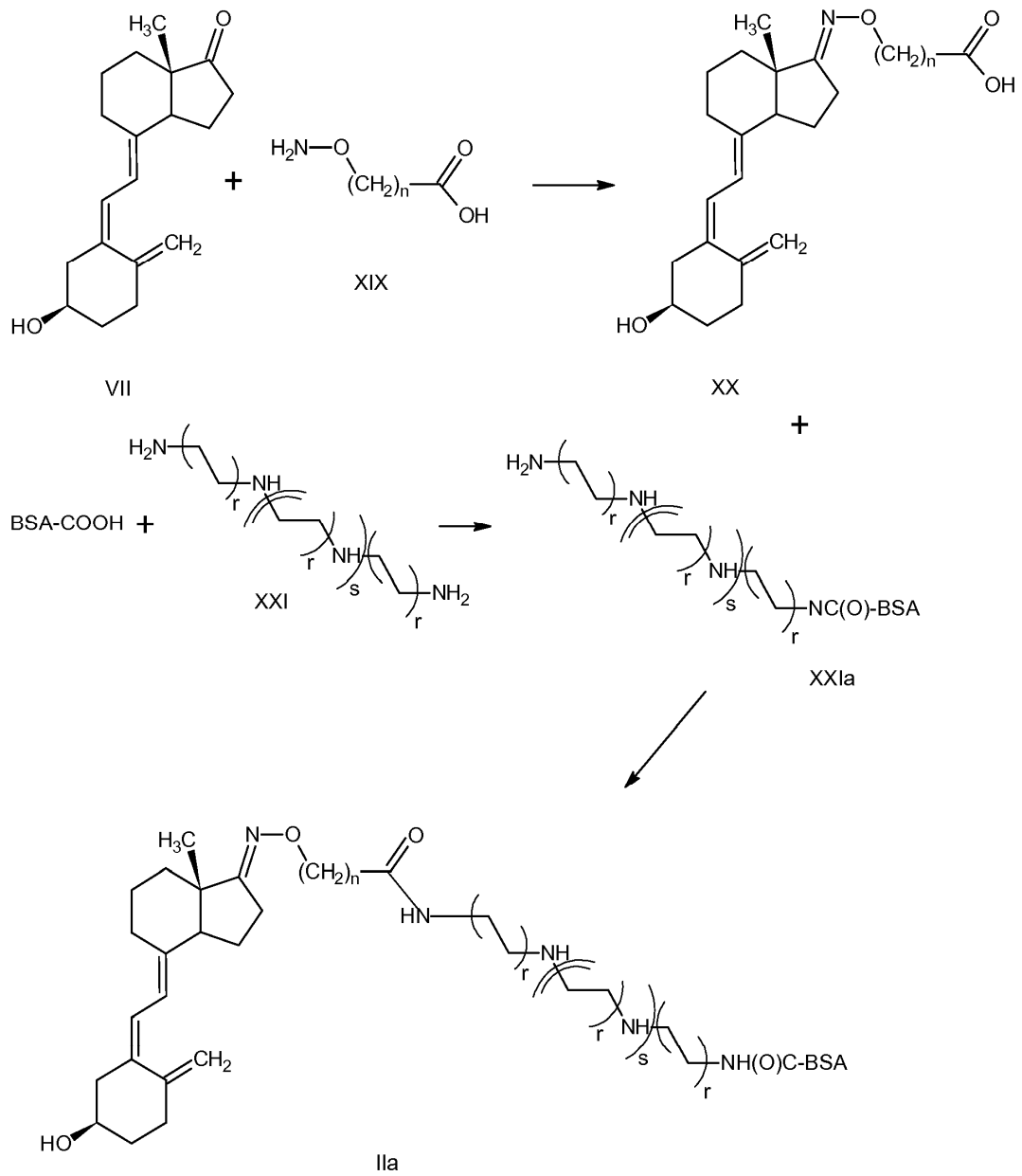


3-epi-25-hidroxivitamina D<sub>2</sub>

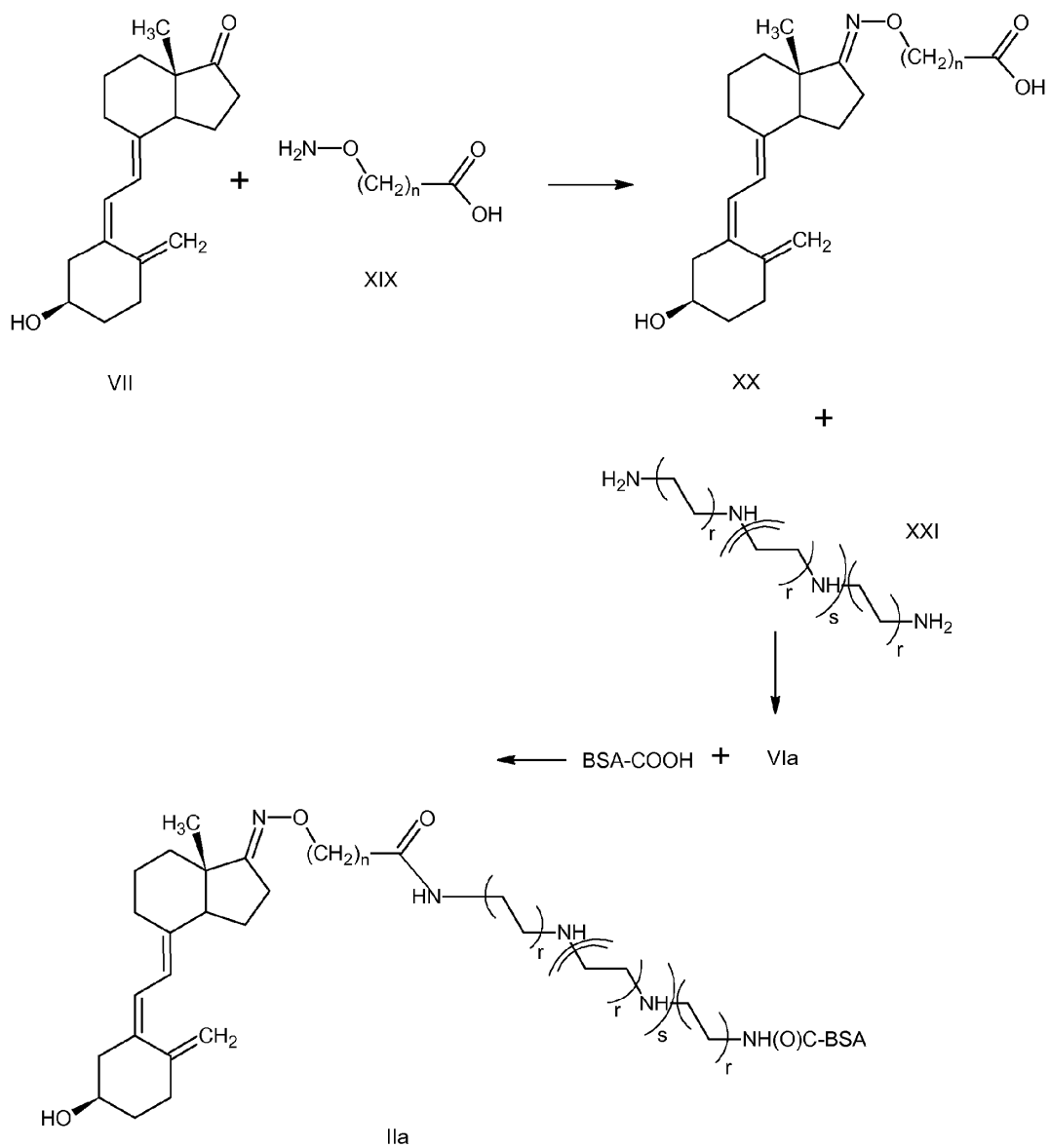
**FIG. 1**



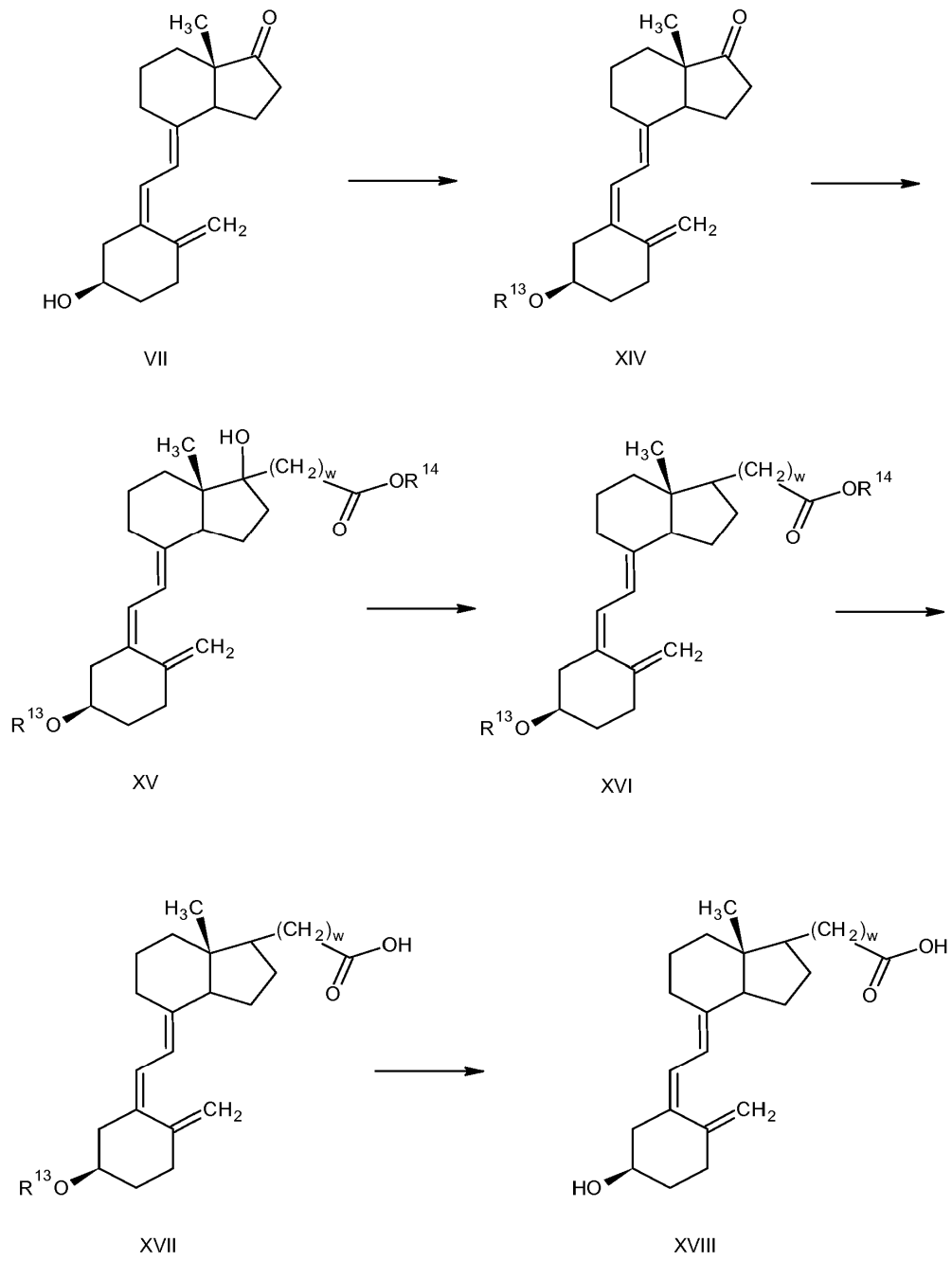
**FIG. 2**



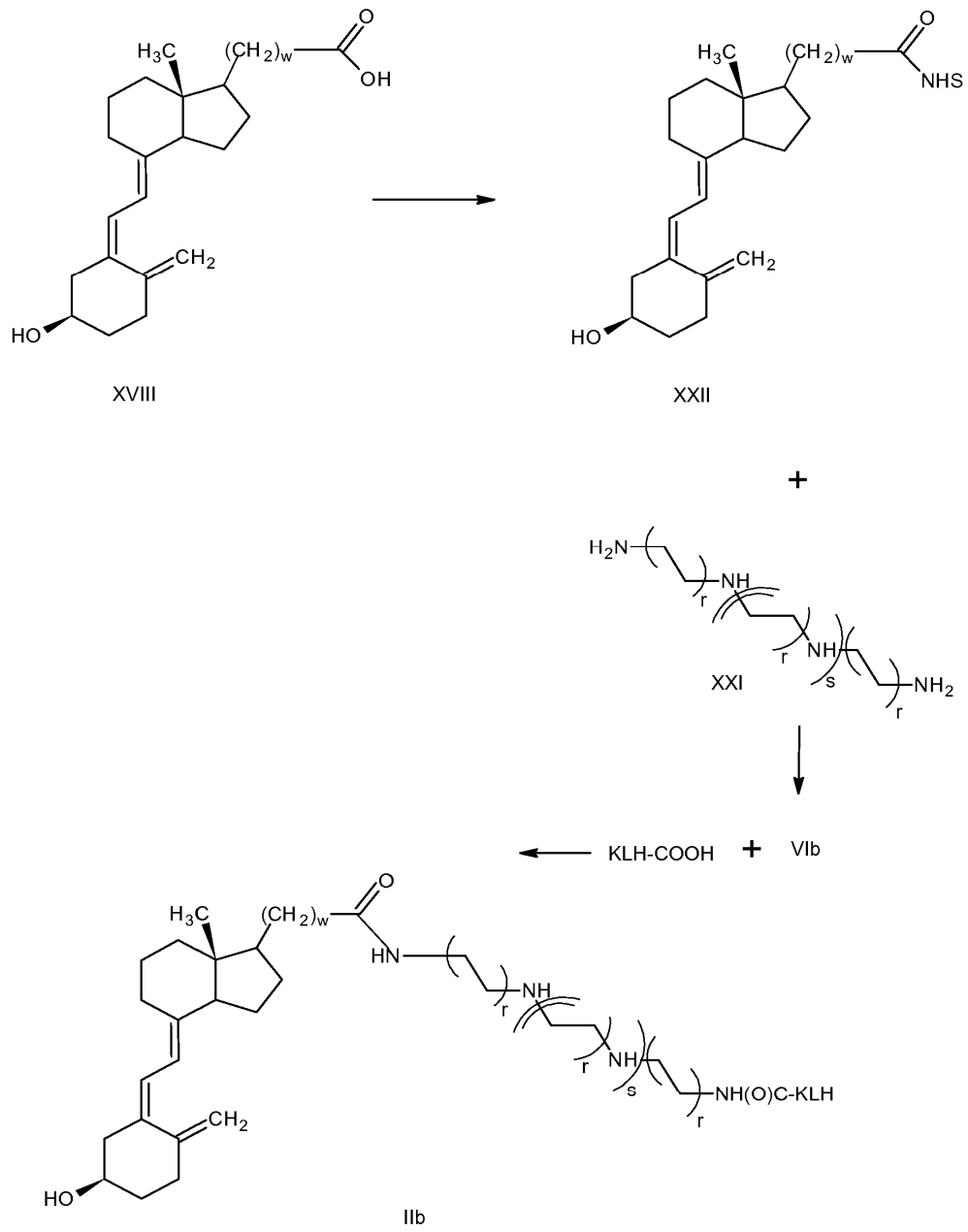
**FIG. 3**



**FIG. 4**

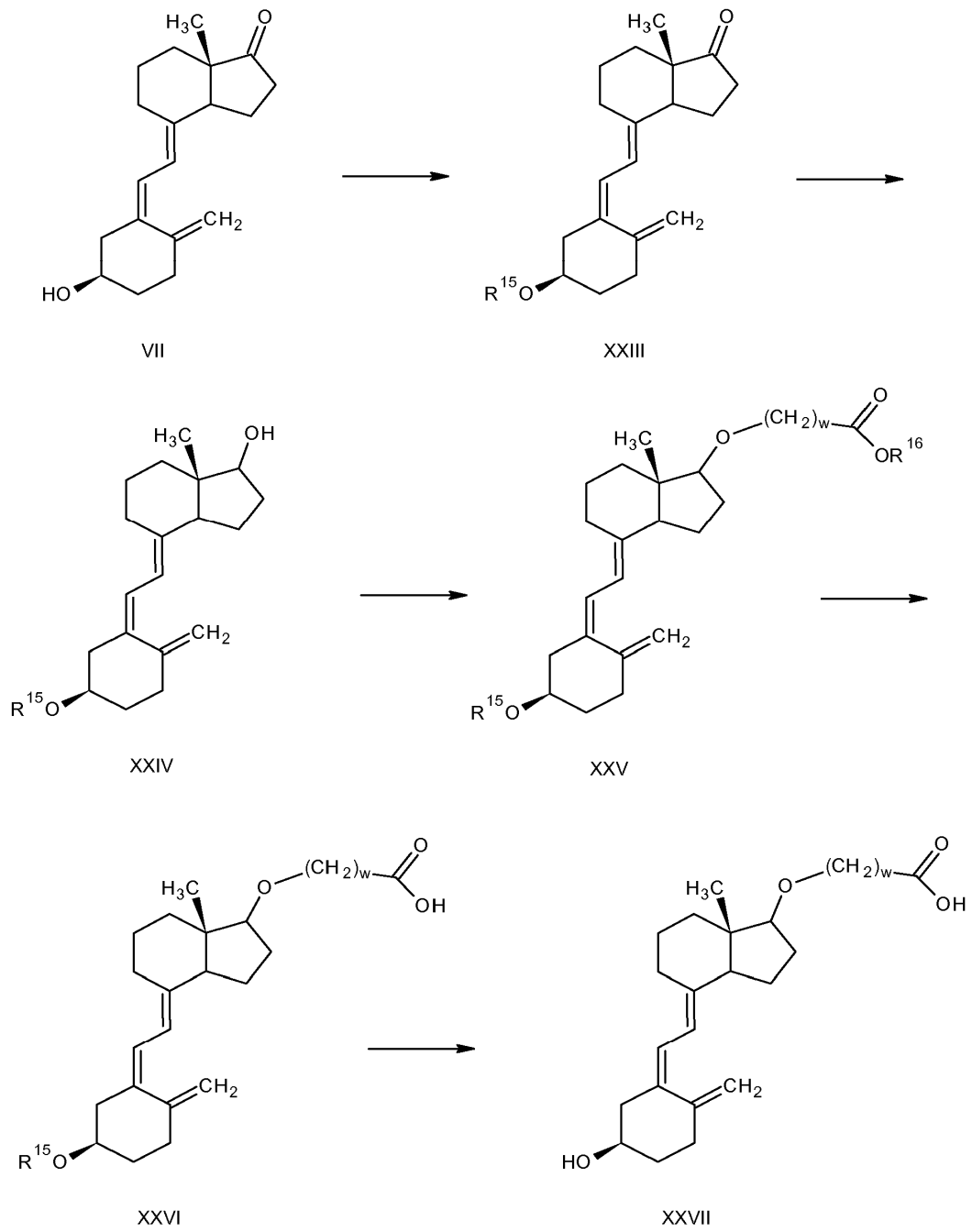


**FIG. 5**

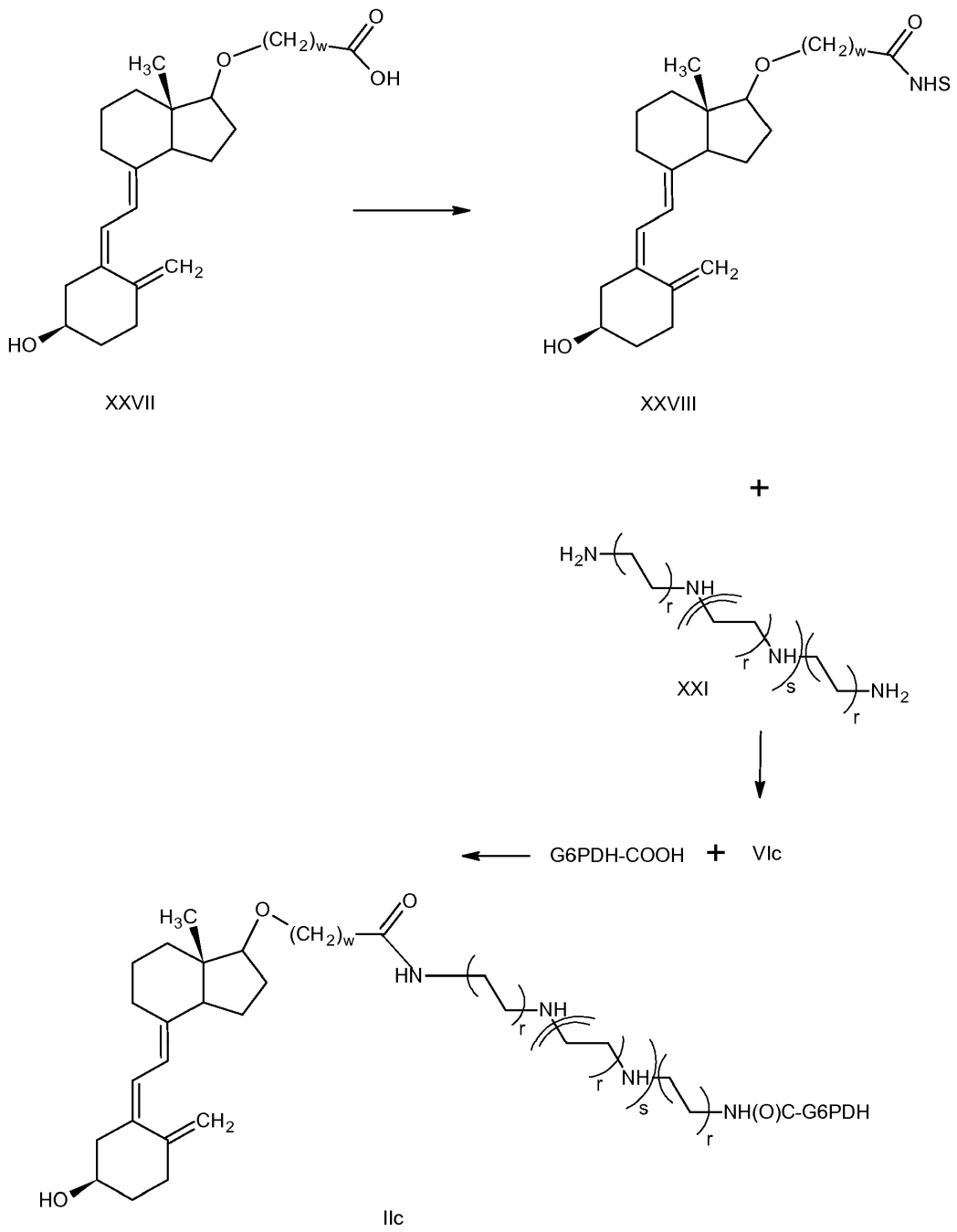


**FIG. 6**

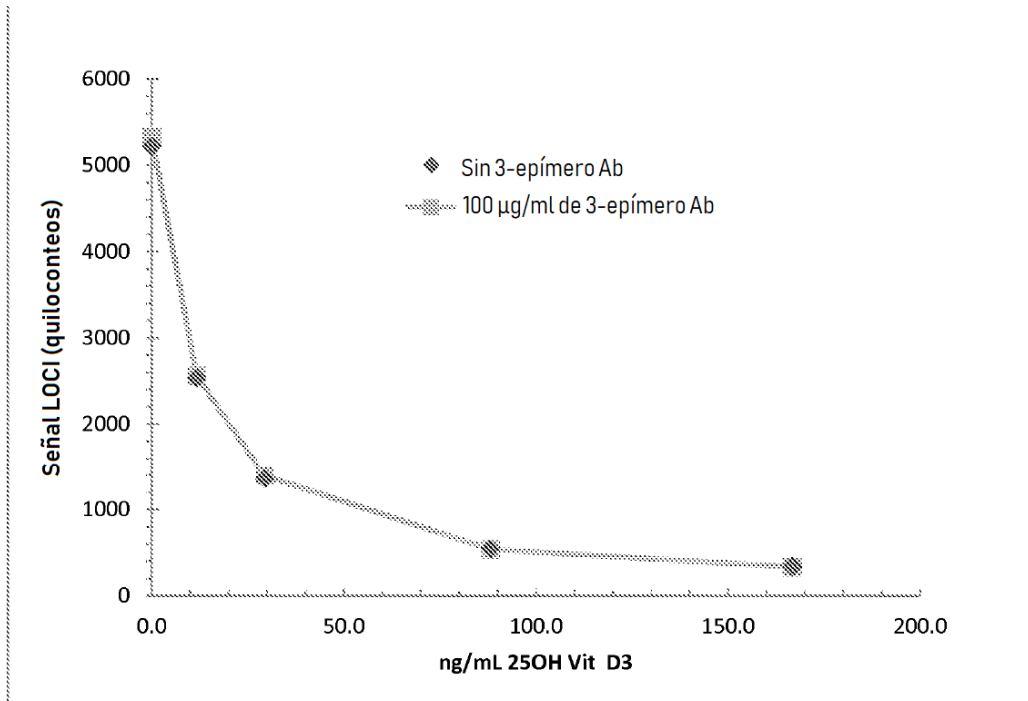




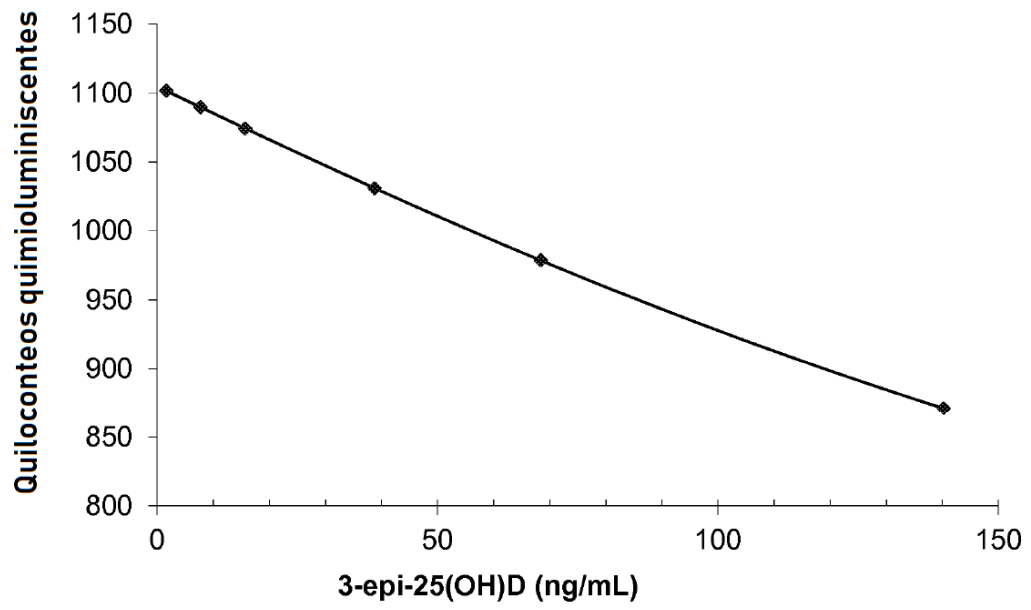
**FIG. 7**



**FIG. 8**



**FIG. 9**



**FIG. 10**