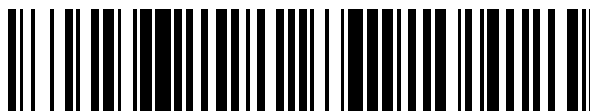


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 398**

51 Int. Cl.:

G01N 33/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2013 PCT/IB2013/002934**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2014 WO14083427**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2013 E 13858240 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2926143**

54 Título: **Composiciones y métodos para detectar vitamina D**

30 Prioridad:

30.11.2012 US 201213690332

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

22.11.2019

73 Titular/es:

SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.

(100.0%)

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

72 Inventor/es:

**TENG, ZHU;
JANZEN, ROLAND y
DRINAN, MARTIN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 732 398 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

Composiciones y métodos para detectar vitamina D

Antecedentes

5 Esta invención se refiere a composiciones, métodos y kits para determinar la presencia y/o la cantidad de vitamina D, incluyendo análogos de vitamina D y metabolitos de los mismos, en una muestra que se sospecha que contiene la misma.

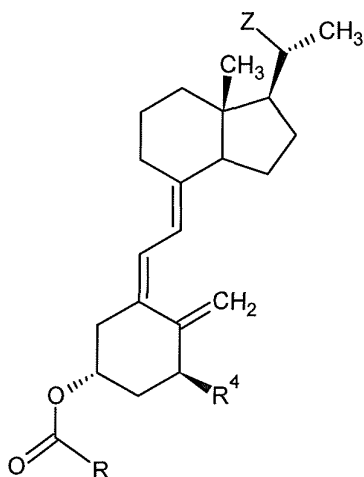
10 El término "vitamina D" se refiere a un grupo de secosteroides solubles en grasa. En los seres humanos, la vitamina D es única porque puede ingerirse como colecalciferol (vitamina D₃) o ergocalciferol (vitamina D₂) y porque el cuerpo también puede sintetizarla (a partir de colesterol) cuando la exposición al sol es adecuada. Debido a esta última propiedad, algunos consideran que la vitamina D es una vitamina alimenticia no esencial, aunque la mayoría la consideran un nutriente esencial. La vitamina D tiene un importante papel fisiológico en la regulación positiva de la homeostasis de iones calcio. La vitamina D₃ es la forma de la vitamina sintetizada por animales. También es un complemento común añadido a productos lácteos y a determinados productos alimenticios, como lo es la vitamina D₂.

15 Tanto la vitamina D₃ alimenticia como la sintetizada intrínsecamente deben someterse a activación metabólica para generar metabolitos bioactivos. En los seres humanos, la etapa inicial de la activación de la vitamina D₃ se produce principalmente en el hígado e implica hidroxilación para formar el metabolito intermedio 25-hidroxicolecalciferol (también denominado calcidiol, calcifediol, 25-hidroxicolecalciferol o 25-hidroxitamina D₃). El calcidiol es la forma principal de vitamina D₃ en el sistema circulatorio. La vitamina D₂ también experimenta activación metabólica similar para dar 25-hidroxitamina D₂. De manera colectiva, estos compuestos se denominan 25-hidroxitamina D (abreviado 25(OH)D) y son los metabolitos principales que se miden en suero para determinar el estado de la vitamina D.

25 Evaluar los niveles de vitamina D en muestras biológicas es importante puesto que la deficiencia de vitamina D está relacionada con varios trastornos en mamíferos. Existe la necesidad de reactivos y métodos para determinaciones precisas y sensibles de concentraciones de vitamina D, análogos de vitamina D y metabolitos de los mismos en muestras.

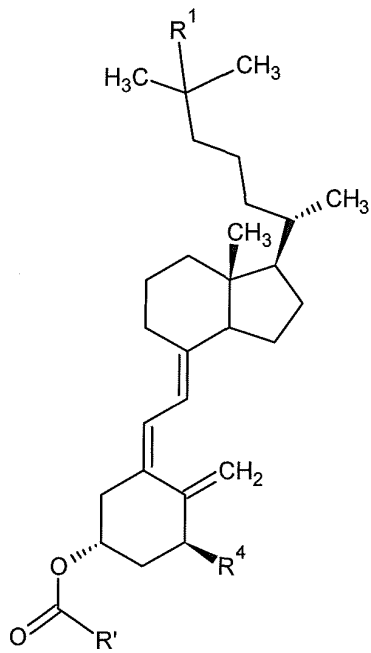
Sumario

Algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento se refieren a un compuesto de fórmula:

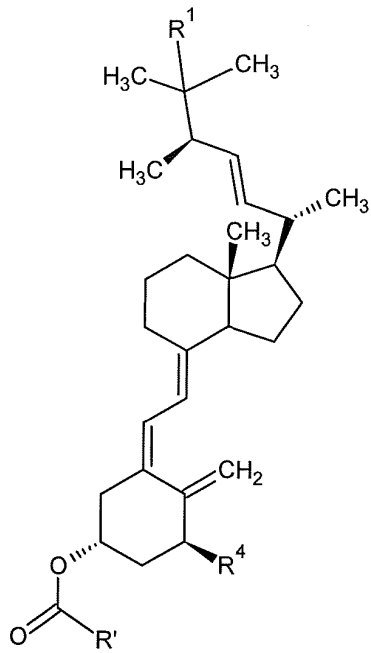


30 según la reivindicación 1.

Algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento se refieren a un compuesto de fórmula:

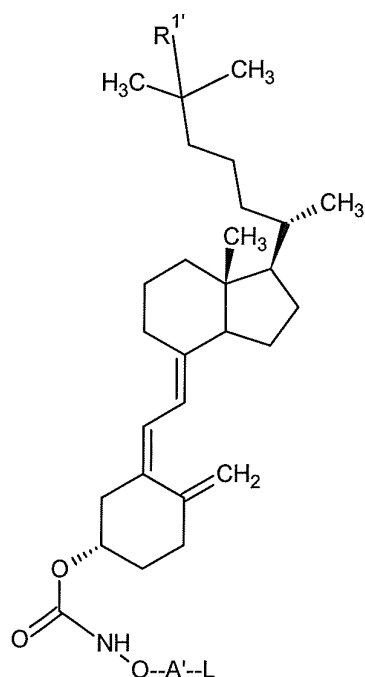


o un compuesto de fórmula:

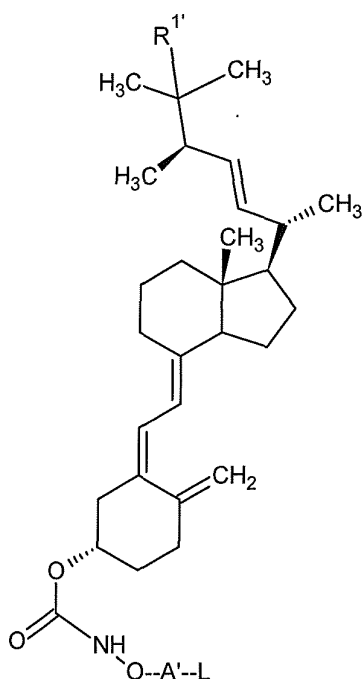


según la reivindicación 3.

- 5 Algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento se refieren a un compuesto de fórmula:



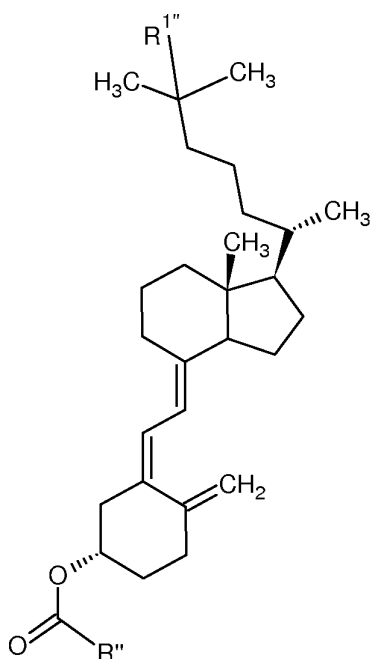
o un compuesto de fórmula:



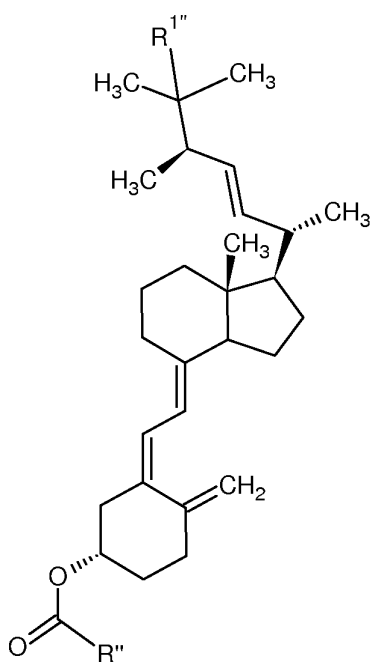
según la reivindicación 6.

- 5 Algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento se refieren a métodos de determinación de una o ambas de la presencia y la cantidad de vitamina D en una muestra que se sospecha que contiene vitamina D. En el método, se proporciona una combinación en un medio que comprende la muestra, un compuesto tal como se describió anteriormente y un elemento de unión específico para vitamina D. En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, se incluye un agente de liberación para liberar vitamina D de
- 10 sustancias de unión endógenas o bien como pretratamiento de la muestra o bien en el medio de ensayo. La combinación se somete a condiciones para la unión del compuesto al elemento de unión específico para formar un complejo. Se mide la cantidad del complejo, donde la cantidad del complejo está relacionada con una o ambas de la presencia y la cantidad de vitamina D en la muestra.
- 15 Algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento se refieren a métodos de determinación de una o ambas de la presencia y la cantidad de vitamina D en una muestra que se sospecha que contiene vitamina

D. Se proporciona una combinación que comprende la muestra, un elemento de unión específico para vitamina D y un compuesto de fórmula:



o un compuesto de fórmula:



5

en la que:

R^{2''} es -NH-O-A''-R^{2'}, en la que R^{2'} es un miembro de un sistema de producción de señales y A'' es un enlace o un grupo de unión, y R^{1''} es H u OH.

10 Opcionalmente, también se incluye un agente de liberación. La combinación se somete a condiciones para la unión del compuesto al elemento de unión específico para formar un complejo, y se mide la cantidad del complejo. La cantidad del complejo está relacionada con la presencia y/o la cantidad de vitamina D en la muestra.

Breve descripción de dibujos

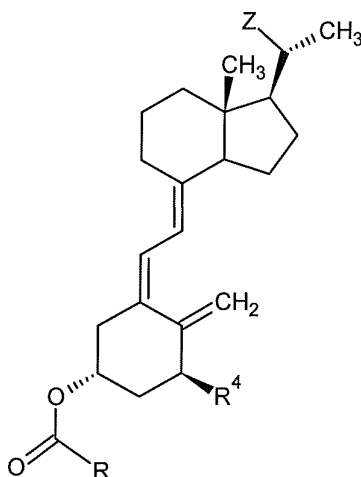
La figura 1 es un diagrama esquemático de una síntesis de compuestos según ejemplos según los principios descritos en el presente documento.

La figura 2 es un diagrama esquemático de una síntesis de compuestos según ejemplos según los principios descritos en el presente documento.

Descripción detallada de realizaciones específicas

Compuestos

- 5 Tal como se mencionó anteriormente, algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento se refieren a compuestos de fórmula:



en la que:

- 10 Z es un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo que tiene, por ejemplo, de 1 a 10, o de 1 a 9, o de 1 a 8, o de 1 a 7, o de 1 a 6, o de 1 a 5, o de 1 a 4, o de 1 a 3, o de 1 a 2, o de 2 a 10, o de 2 a 9, o de 2 a 8, o de 2 a 7, o de 2 a 6, o de 2 a 5, o de 2 a 4, o de 2 a 3, o de 3 a 10, o de 3 a 9, o de 3 a 8, o de 3 a 7, o de 3 a 6, o de 3 a 5, o de 3 a 4, o de 4 a 10, o de 4 a 9, o de 4 a 8, o de 4 a 7, o de 4 a 6, o de 4 a 5, o de 5 a 10, o de 5 a 9, o de 5 a 8, o de 5 a 7, o de 5 a 6, o de 6 a 10, o de 6 a 9, o de 6 a 8, o de 6 a 7, o de 7 a 10, o de 7 a 9, o de 7 a 8, o de 8 a 10, o de 8 a 9, o de 9 a 10, átomos de carbono, que puede estar no sustituido o uno o más de los cuales puede estar sustituido por uno o más de hidroxilo, alcoxilo de 1 a 5, o de 1 a 4, de 1 a 3, o de 1 a 2, o de 2 a 5, o de 2 a 4, o de 2 a 3, o de 3 a 5, o de 3 a 4, o de 4 a 5 átomos de carbono, oxo u oxima; y

- 15 R es -NH-O-(A)_k-R², R² es un miembro de un sistema de producción de señales, -(CH₂)_nCOOH, -(CH₂)_mCOONHS (NHS es N-hidroxisuccinimida), una molécula pequeña, una pareja de unión para una molécula pequeña, o un soporte; A es un enlace cuando k es 0 y un grupo de unión cuando k es 1; k es 0 o 1; n es un número entero de 1 a 5, o de 1 a 4, de 1 a 3, o de 1 a 2, o de 2 a 5, o de 2 a 4, o de 2 a 3, o de 3 a 5, o de 3 a 4, o de 4 a 5 y m es un número entero de 1 a 5, o de 1 a 4, de 1 a 3, o de 1 a 2, o de 2 a 5, o de 2 a 4, o de 2 a 3, o de 3 a 5, o de 3 a 4, o de 4 a 5; y

R⁴ es H, OH o alcoxilo inferior.

- 25 El término "alquilo" incluye aquellos grupos alquilo de un número designado de átomos de carbono de una configuración o bien lineal, ramificada o bien cíclica. Los ejemplos de "alquilo" incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec- y terc-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, norbornilo, por ejemplo.

- 30 El término "alquenilo" incluye cadenas hidrocarbonadas de un número especificado de átomos de carbono de una configuración o bien lineal o bien ramificada y al menos un doble enlace carbono-carbono, que puede aparecer en cualquier punto a lo largo de la cadena, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo, dimetilpentenilo, por ejemplo.

El término "alquinilo" se refiere a un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada de un número especificado de átomos de carbono que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono, incluyendo, pero sin limitarse a, etinilo, 1-propinilo, 2-propinilo, 1-butinilo y 2-butinilo, por ejemplo.

- 35 El término "alcoxilo" incluye grupos alquilo de un número designado de átomos de carbono de una configuración o bien lineal, ramificada o bien cíclica en la que el grupo alquilo incluye un oxígeno de éter para unirse a un compuesto original.

En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, el grupo de unión A tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 2000, o menos de aproximadamente 1500, o menos de aproximadamente

1000, o menos de aproximadamente 500, o menos de aproximadamente 300, o menos de aproximadamente 200, o menos de aproximadamente 150, por ejemplo. El grupo de unión puede comprender de aproximadamente 2 a aproximadamente 200 átomos, o de 4 a aproximadamente 150 átomos, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 átomos, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 átomos, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 átomos, sin contar el hidrógeno, y puede comprender una cadena de desde 2 hasta aproximadamente 100 átomos, o de 3 a aproximadamente 90 átomos, o de aproximadamente 4 a aproximadamente 80 átomos, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 70 átomos, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 átomos, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 átomos, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 átomos, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 átomos, por ejemplo, seleccionado cada uno independientemente del grupo que consiste en carbono, oxígeno, azufre, nitrógeno y fósforo. El número de heteroátomos en el grupo de unión depende del tamaño del grupo de unión y, en algunos ejemplos, el número está en el intervalo de desde 0 hasta aproximadamente 30, o de 1 a aproximadamente 25, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 20, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 15, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 5, por ejemplo.

Los heteroátomos pueden estar en forma de una o más funcionalidades incluyendo, pero sin limitarse a, una o más de amina (primaria, secundaria o terciaria), carbamato, éter, éster, amida, urea, sulfonamida, tioéter, hidrazona, hidrazida, amidina y éster de fosfato, por ejemplo. En un ejemplo según los principios descritos en el presente documento, el grupo de unión comprende dos átomos de nitrógeno en forma de funcionalidades de amina secundaria y un grupo carbonilo en una cadena de aproximadamente 6 a aproximadamente 20, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 15, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 20, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 15, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 9, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 8, o de aproximadamente 7 átomos, número de átomos que incluye átomos de carbono.

En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, el grupo de unión es una macromolécula y puede ser polimérica. Las macromolécula polimérica tiene en general de aproximadamente 1 a aproximadamente 10.000 unidades monoméricas o más de longitud, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 10.000 unidades monoméricas de longitud, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 10.000 unidades monoméricas de longitud, o de aproximadamente 500 a aproximadamente 10.000 unidades monoméricas de longitud, o de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 10.000 unidades monoméricas de longitud, o de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 10.000 unidades monoméricas de longitud, o de aproximadamente 3.000 a aproximadamente 10.000 unidades monoméricas de longitud, o de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 10.000 unidades monoméricas de longitud, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 8.000 unidades monoméricas de longitud, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 8.000 unidades monoméricas de longitud, o de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 8.000 unidades monoméricas de longitud, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 7.000 unidades monoméricas de longitud y similares. El número de unidades monoméricas depende del número de átomos en la cadena de unidades monoméricas, de la composición de la unidad monomérica, etc.

El peso molecular de la macromolécula polimérica es de al menos aproximadamente 2.000. El peso molecular puede ser de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 10.000.000 o más, o de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 8.000.000, o de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 6.000.000, o de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 5.000.000 o de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 4.000.000, o de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 3.000.000 o de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 2.000 a aproximadamente 2.000 a aproximadamente 1.000.000, o de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 10.000.000 o más, o de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 8.000.000, o de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 6.000.000, o de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 5.000.000 o de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 4.000.000, o de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 3.000.000 o de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 2.000.000, o de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 1.000.000, o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 10.000.000 o más, o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 8.000.000, o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 6.000.000, o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 5.000.000 o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 4.000.000, o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 3.000.000 o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 2.000.000, o de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 1.000.000, y similares.

La macromolécula polimérica puede ser lineal o ramificada o una combinación de las mismas. Un polímero lineal comprende una cadena lineal de átomos y un polímero ramificado comprende una cadena ramificada de átomos. Cada átomo de la cadena lineal puede tener uno o más sustituyentes en lugar de hidrógeno. En algunas realizaciones, el polímero puede ser un copolímero que comprende más de un tipo de unidad monomérica. En algunas realizaciones, una o más de las unidades monoméricas de la macromolécula polimérica comprenden átomos de carbono y uno o más heteroátomos tales como, por ejemplo, oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo, y similares.

La macromolécula polimérica puede ser un material que se produce de manera natural o un constructo sintético. En algunas realizaciones, la macromolécula polimérica es un polipéptido. Los ejemplos de polipéptidos que se producen

- de manera natural, a modo de ilustración y no de limitación, incluyen proteínas tales como, por ejemplo, albúminas y globulinas, que pueden ser de origen humano o de otro animal. Las albúminas incluyen, por ejemplo, albúmina sérica humana y albúmina sérica bovina. Las globulinas incluyen, por ejemplo, gamma-globulinas e inmunoglobulinas. Los ejemplos de otras macromolécula poliméricas, a modo de ilustración y no de limitación,
- 5 incluyen dendrímeros, carboxilatos poliméricos (por ejemplo, poli(ácido aspártico), poli(ácido glutámico), poli(ácido galacturónico), poli(ácido metacrílico), etc.), aminas poliméricas (por ejemplo, polietilamina, polilisina, poliglutamina, polietilenimina, polialilamina, etc.), éteres poliméricos (polietilenglicoles u óxido de polietileno, etc.), tioéteres poliméricos (por ejemplo, tioéteres de polietileno, etc.), sulfhidrilos poliméricos (por ejemplo policisteína) etc.
- 10 Tal como se mencionó anteriormente, en algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, R² puede ser un miembro de un sistema de producción de señales. El sistema de producción de señales puede tener uno o más componentes, siendo al menos un componente un marcador. El sistema de producción de señales genera una señal que está relacionada con la presencia de vitamina D en una muestra. El sistema de producción de señales incluye todos los reactivos requeridos para producir una señal medible. Otros componentes del sistema de
- 15 producción de señales pueden incluirse en una disolución de revelador y pueden incluir, pero no se limitan a, sustratos, potenciadores, activadores, compuestos quimioluminiscentes, cofactores, inhibidores, eliminadores, iones metálicos y sustancias de unión específicas requeridas para la unión de las sustancias de generación de señales, por ejemplo. Otros componentes del sistema de producción de señales pueden ser coenzimas, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, otras enzimas y catalizadores, por ejemplo. El sistema de producción de
- 20 señales proporciona una señal detectable mediante medios externos, mediante el uso de radiación electromagnética, de manera deseable mediante examen visual. Se describen sistemas de producción de señales a modo de ejemplo en la patente estadounidense nº 5.508.178.
- El término “marcador” incluye marcadores de poli(aminoácido) y marcadores distintos de poli(aminoácido). El término “restos de marcador de poli(aminoácido)” incluye marcadores que son proteínas tales como, pero sin limitarse a,
- 25 enzimas, anticuerpos, péptidos e inmunógenos, por ejemplo. Con las proteínas marcadoras tales como, por ejemplo, enzimas, el intervalo de peso molecular será de desde aproximadamente 10.000 hasta aproximadamente 600.000, o desde aproximadamente 10.000 hasta aproximadamente 300.000 de peso molecular. Habitualmente hay al menos un compuesto según los principios descritos en el presente documento (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
- 30 aproximadamente 50.000 de peso molecular, por ejemplo, de la proteína. En el caso de las enzimas, el número de grupos análogos habitualmente es de desde 1 hasta aproximadamente 20, de aproximadamente 2 a aproximadamente 15, de aproximadamente 3 a aproximadamente 12, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 10.
- 35 Las enzimas incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, enzimas redox tales como, por ejemplo, deshidrogenasas, por ejemplo, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa; enzimas que están implicadas en la producción de peróxido de hidrógeno y en el uso del peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante para dar un colorante tal como, por ejemplo, peroxidasa del rábano picante, lactoperoxidasa y microperoxidasa; hidrolasas tales como, por ejemplo, fosfatasa alcalina y β-galactosidasa; luciferasas tales como,
- 40 por ejemplo luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; transferasas; combinaciones de enzimas tales como, pero sin limitarse a, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa y galactosa oxidasas, o heterocíclico oxidasas, tales como uricasa y xantina oxidasas, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante, es decir, una peroxidasa tal como peroxidasa del rábano, lactoperoxidasa o microperoxidasa, por ejemplo.
- 45 El término “marcadores distintos de poli(aminoácido)” incluye aquellos marcadores que no son proteínas. Los marcadores distintos de poli(aminoácido) pueden detectarse directamente o pueden detectarse a través de una reacción que produce una señal detectable. El marcador distinto de poli(aminoácido) puede ser isotópico y no isotópico y puede ser, a modo de ilustración y no de limitación, un radioisótopo, un compuesto luminiscente (que incluye, pero no se limita a ésteres de acridinio, compuestos fluorescentes y compuestos quimioluminiscentes, por
- 50 ejemplo), un polinucleótido que codifica para un catalizador, un promotor, un colorante, una coenzima, un sustrato enzimático, un grupo radiactivo y una secuencia de polinucleótido amplificable, por ejemplo. En algún ejemplo, los marcadores distintos de poli(aminoácido) son de tipo radioisótopo, luminiscente (tales como, por ejemplo, ésteres de acridinio), particulado (tales como, por ejemplo, partículas magnéticas que pueden separar partículas unidas de no unidas, partículas de látex que pueden medirse mediante turbidez y nefelometría), y perlas de quimioluminiscencia
- 55 (por ejemplo, perlas quimioluminiscentes (*chemibeads*) de LOCI), por ejemplo.
- Tal como se mencionó anteriormente, en algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, R² puede ser una molécula orgánica pequeña de peso molecular de aproximadamente 200 a aproximadamente 2.000, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 1.500, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 1.000, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 500. Tales moléculas orgánicas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, biotina, moléculas fluorescentes (tales como fluoresceína y rodamina, por ejemplo), moléculas quimioluminiscentes y dinitrofenol, por ejemplo. Una pareja de unión para una molécula orgánica pequeña es una molécula que reconoce y se une específicamente a la molécula pequeña. Las parejas de unión para una molécula

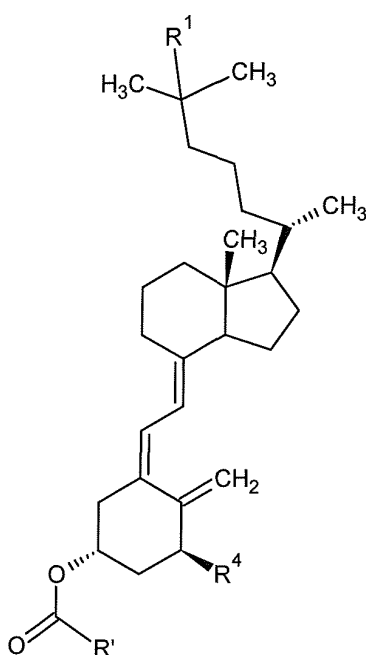
pequeña se definen por la naturaleza de la molécula pequeña e incluyen, pero no se limitan a, avidina, estreptavidina, anticuerpo frente a la molécula orgánica pequeña (que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpo frente a una molécula fluorescente (tal como anticuerpo frente a fluoresceína y anticuerpo frente a rodamina, por ejemplo), anticuerpo frente a una molécula quimioluminiscente y anticuerpo frente a dinitrofenol, por ejemplo.

- 5 Tal como se mencionó anteriormente, en algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, R^2 puede ser un soporte, que puede estar compuesto por un material insoluble en agua, sólido o fluido, orgánico o inorgánico y que puede ser transparente o parcialmente transparente. El soporte puede tener cualquiera de varias formas, tal como, pero sin limitarse a, una partícula (soporte particulado) incluyendo una perla, una película, una membrana, un tubo, un pocillo, una tira, una varilla, una fibra o una superficie plana tal como, por ejemplo, una placa o papel, por ejemplo. El soporte puede suspenderse o no en el medio en el que se emplea. Ejemplos de soportes que pueden suspenderse 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), poliacrilamida, poliacrilato, polietileno, polipropileno, poli(4-metilbuteno), poliestireno, polimetacrilato, poli(tereftalato de etileno), nailon, poli(butirato de vinilo), por ejemplo, o bien usados por sí mismos o conjuntamente con otros materiales. El soporte puede marcarse adicionalmente o no con un colorante, catalizador u otro grupo detectable, por ejemplo.

- En algunos ejemplos según 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 micrómetros y no más de aproximadamente 100 micrómetros. En algunos ejemplos, las partículas tienen un diámetro promedio de desde aproximadamente 0,05 micrómetros hasta aproximadamente 20 micrómetros, o desde aproximadamente 0,3 micrómetros hasta aproximadamente 10 micrómetros. La partícula puede ser orgánica o inorgánica, hinchable o no hinchable, porosa o no porosa, preferiblemente de una densidad que se aproxima a la del agua, en general desde aproximadamente 0,7 g/ml hasta aproximadamente 1,5 g/ml, y está compuesta por material que puede ser transparente, parcialmente transparente u opaco. Las partículas pueden ser materiales biológicos tales como células y microorganismos, por ejemplo, eritrocitos, leucocitos, linfocitos, hibridomas, estreptococos, *Staphylococcus aureus* y *E. coli*, virus, por ejemplo. Las partículas también pueden ser partículas compuestas por 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.

- En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, Z en la fórmula anterior es $-(CH_2)_sC(CH_3)_2-R^1$ en la que s es un número entero de 1 a 5, o de 1 a 4, de 1 a 3, o de 1 a 2, o de 2 a 5, o de 2 a 4, o de 2 a 3, o de 3 a 5, o de 3 a 4, o de 4 a 5, o 3, o 2, o 1, y R^1 es H, OH u OH protegido. En un ejemplo particular, R^1 es OH.

- 35 En un ejemplo particular, según los principios descritos en el presente documento, s es 3 y el compuesto tiene la fórmula:



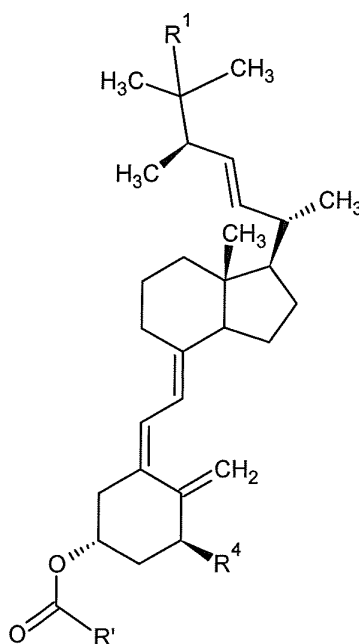
en la que:

R' es $-\text{NH-O-(A)}_k\text{-R}^2$, en la que R² es un miembro de un sistema de producción de señales, $-(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_m\text{COONHS}$ (NHS es N-hidroxisuccinimida), una molécula pequeña, o una pareja de unión para una molécula pequeña, un soporte, k es 0 o 1, A es un enlace cuando k es 0 y un grupo de unión cuando k es 1, n es un número entero de 1 a 5 y m es un número entero de 1 a 5;

5 R¹ es H, OH u OH protegido. En un ejemplo particular, R¹ es OH; y

R⁴ es H, OH o alcoxilo inferior. En un ejemplo particular, R⁴ es H. En otro ejemplo particular, R⁴ es OH.

10 En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, Z en la fórmula anterior es $-(\text{CH}=\text{CH})(\text{CH}_2)_v\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_3)_2\text{-R}^1$ en la que v es un número entero de 0 a 5, o de 0 a 4, de 0 a 3, o de 0 a 2, o de 0 a 1, o de 1 a 5, o de 1 a 4, de 1 a 3, o de 1 a 2, o de 2 a 5, o de 2 a 4, o de 2 a 3, o de 3 a 5, o de 3 a 4, o de 4 a 5, o 3, o 2, o 1, y R¹ es H, OH u OH protegido. En un ejemplo particular, R¹ es OH. En un ejemplo particular, según los principios descritos en el presente documento, v es 0 y el compuesto tiene la fórmula:



en la que:

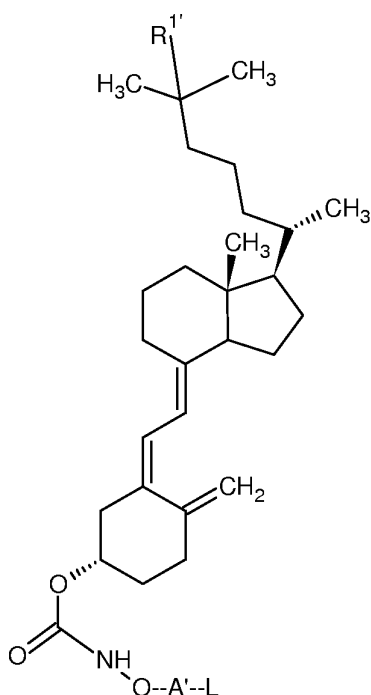
15 R' es $-\text{NH-O-(A)}_k\text{-R}^2$, en la que R² es un miembro de un sistema de producción de señales, $-(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, $-(\text{CH}_2)_m\text{COONHS}$ (NHS es N-hidroxisuccinimida), una molécula pequeña, o una pareja de unión para una molécula pequeña, un soporte, k es 0 o 1, A es un enlace cuando k es 0 y un grupo de unión cuando k es 1, n es un número entero de 1 a 5 y m es un número entero de 1 a 5;

R¹ es H, OH u OH protegido. En un ejemplo particular, R¹ es OH; y

R⁴ es H, OH o alcoxilo inferior. En un ejemplo particular, R⁴ es H. En otro ejemplo particular, R⁴ es OH.

20 Algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento se refieren a derivados de 25-OH-vitamina D₂ y derivados de 25-OH-vitamina D₃ que comprenden un enlace de carbamato a otro resto o bien directamente o bien a través de la intermediación de un grupo de unión. El resto puede ser, pero no se limita a, un miembro de un sistema de producción de señales, un soporte o un miembro de un par de unión específico.

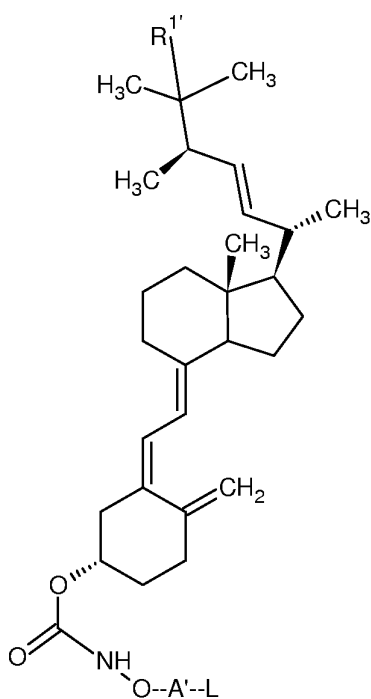
En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, el compuesto tiene la fórmula:



en la que:

L se selecciona del grupo que consiste en partículas magnéticas, ésteres de acridinio, una combinación de
 5 partículas magnéticas y ésteres de acridinio (tales como, por ejemplo, partículas paramagnéticas marcadas con
 éster de acridinio), partículas quimioluminiscentes y partículas sensibilizadoras; y $R^{1'}$ es OH y A' es un enlace o un
 grupo de unión tal como se describió anteriormente. En algunos ejemplos, el grupo de unión tiene la fórmula $-(CH_2)_p-$
 $C(O)-(W)_b-(CH_2)_q-(X)_c-(CH_2)_r-$ en la que W y X son cada uno independientemente -NH- y -O-, b y c son cada uno
 10 independientemente 0 o 1, p es un número entero de 1 a 5, o de 1 a 4, o de 1 a 3, o de 1 a 2, o de 2 a 5, o de 2 a 4,
 o de 2 a 3, o de 3 a 5, o de 3 a 4, o de 4 a 5, q es un número entero de 1 a 5, o de 1 a 4, o de 1 a 3, o de 1 a 2, o de
 2 a 5, o de 2 a 4, o de 2 a 3, o de 3 a 5, o de 3 a 4, o de 4 a 5 y R es un número entero de 1 a 5, o de 1 a 4, o de 1 a
 3, o de 1 a 2, o de 2 a 5, o de 2 a 4, o de 2 a 3, o de 3 a 5, o de 3 a 4, o de 4 a 5. En un ejemplo, b y c son cada uno
 1, p es 1, q es 2 y R es 1. En algunos ejemplos, el grupo de unión tiene la fórmula $-(CH_2)_p-C(O)-NH-(CH_2)_q-NH-$
 $(CH_2)_r-$ en la que p, q y r son tal como se definieron anteriormente.

En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, el compuesto tiene la fórmula:



15

en la que:

L se selecciona del grupo que consiste en partículas magnéticas, ésteres de acridinio, una combinación de partículas magnéticas y ésteres de acridinio (tales como, por ejemplo, partículas paramagnéticas marcadas con éster de acridinio), partículas quimioluminiscentes y partículas sensibilizadoras; y R¹ es OH y A' es un enlace o un grupo de unión tal como se describió anteriormente. En algunos ejemplos, el grupo de unión tiene la fórmula $-(CH_2)_p-C(O)-(W)_b-(CH_2)_q-(X)_c-(CH_2)_r-$ en la que W y X son cada uno independientemente -NH- y -O-, b y c son cada uno independientemente 0 o 1, p es un número entero de 1 a 5, o de 1 a 4, o de 1 a 3, o de 1 a 2, o de 2 a 5, o de 2 a 4, o de 2 a 3, o de 3 a 5, o de 3 a 4, o de 4 a 5, q es un número entero de 1 a 5, o de 1 a 4, o de 1 a 3, o de 1 a 2, o de 2 a 5, o de 2 a 4, o de 2 a 3, o de 3 a 5, o de 3 a 4, o de 4 a 5 y R es un número entero de 1 a 5, o de 1 a 4, o de 1 a 3, o de 1 a 2, o de 2 a 5, o de 2 a 4, o de 2 a 3, o de 3 a 5, o de 3 a 4, o de 4 a 5. En un ejemplo, b y c son cada uno 1, p es 1, q es 2 y R es 1. En algunos ejemplos, el grupo de unión tiene la fórmula $-(CH_2)_p-C(O)-NH-(CH_2)_q-NH-(CH_2)_r-$ en la que p, q y r son tal como se definieron anteriormente.

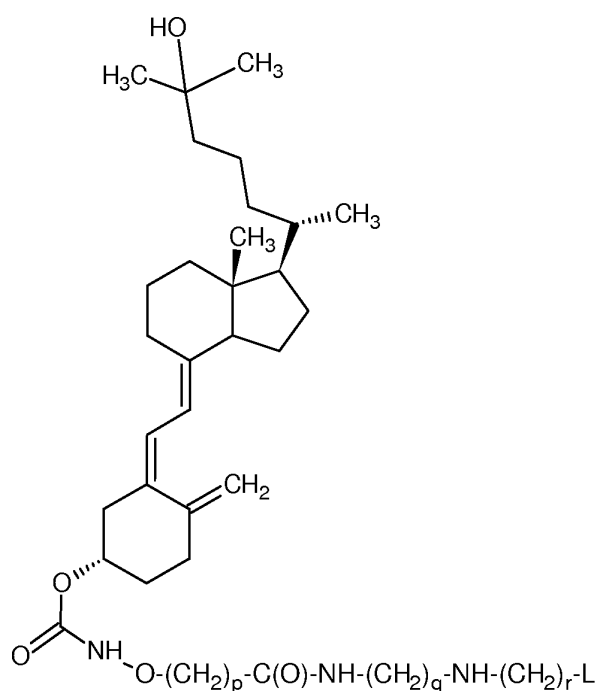
Las partículas magnéticas incluyen partículas paramagnéticas, partículas ferromagnéticas y partículas diamagnéticas. Tales partículas incluyen, pero no se limitan a, metales de transición de los periodos 4-7 de la Tabla Periódica incluyendo cromo, cobre, cobalto, aluminio, manganeso, hierro y níquel,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

Las partículas quimioluminiscentes son partículas que tienen asociado con ellas un compuesto quimioluminiscente. La expresión "asociado con ellas" tal como se usa en el presente documento significa que un compuesto tal como, por ejemplo, un compuesto quimioluminiscente y una partícula pueden asociarse mediante unión directa o indirecta, adsorción, absorción, incorporación o disolución, por ejemplo. Ejemplos de compuestos quimioluminiscentes que pueden utilizarse son los expuestos en las patentes estadounidenses n.ºs 5.340.716 y 6.251.581. En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, el compuesto quimioluminiscente es una sustancia fotoactivable que experimenta una reacción química con la excitación directa o sensibilizada por la luz o tras la reacción con oxígeno singlete para formar un producto de reacción metaestable que puede descomponerse con la emisión simultánea o posterior de luz, habitualmente en el intervalo de longitud de onda de 250 a 1200 nm. El término "fotoactivable" incluye "activable fotoquímicamente". En algunos ejemplos, los compuestos quimioluminiscentes son aquellos que reaccionan con oxígeno singlete para formar dioxetanos o dioxetanonas. Estas últimas son habitualmente olefinas ricas en electrones. Ejemplos de tales olefinas ricas en electrones son enol éteres, enaminas, 9-alkiliden-N-alkilacridanos, arilvinil éteres, dioxenos, arilimidazoles, 9-alkiliden-xantanos y lucigenina. Otros compuestos incluyen luminol y otras ftalhidrazidas y compuestos quimioluminiscentes que están protegidos frente a experimentar una reacción quimioluminiscente en virtud de su protección por un grupo protector fotoquímicamente lábil, incluyendo tales compuestos, por ejemplo, luciferina de luciérnaga, acuoforina y luminol. Ejemplos de tales compuestos quimioluminiscentes que pueden utilizarse son los expuestos en la patente estadounidense n.º 5.709.994.

Las partículas sensibilizadoras son partículas que tienen asociado con ellas un compuesto sensibilizador, que incluye, pero no se limita a, un compuesto fotosensibilizador. Ejemplos de sensibilizador compuestos que pueden utilizarse se exponen en las patentes estadounidenses n.ºs 5.340.716 y 6.251.581.

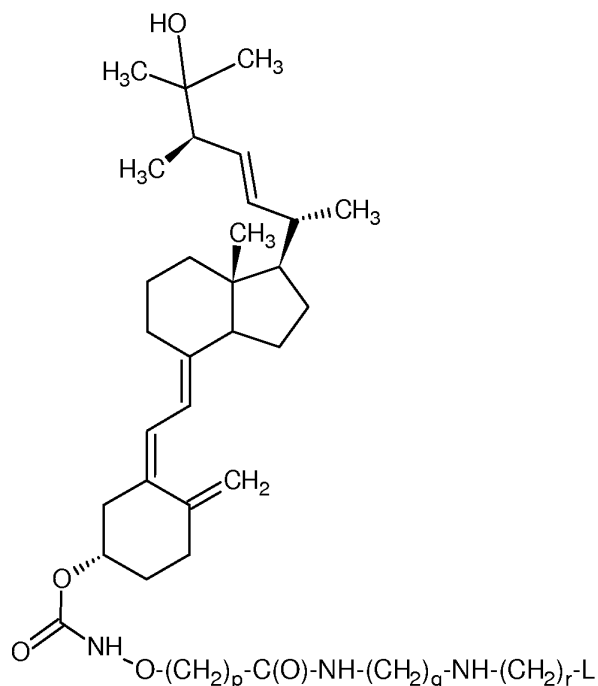
Un fotosensibilizador es un sensibilizador para la generación de oxígeno singlete habitualmente mediante excitación con luz. En algunos ejemplos, el fotosensibilizador absorbe a una longitud de onda mayor que el compuesto quimioluminiscente y tiene un triplete de energía inferior que el compuesto quimioluminiscente. El fotosensibilizador puede ser fotoactivable (por ejemplo, colorantes y compuestos aromáticos). El fotosensibilizador es habitualmente un compuesto que se compone de átomos unidos covalentemente, de manera habitual con múltiples enlaces dobles o triples conjugados. El compuesto debe absorber luz en el intervalo de longitud de onda de 200-1100 nm, habitualmente 300-1000 nm, preferiblemente 450-950 nm. Los fotosensibilizadores típicos incluyen, pero no se limitan a, acetona, benzofenona, 9-tioxantona, eosina, 9,10-dibromoantraceno, azul de metileno, metaloporfirinas (por ejemplo, hematoporfirina), ftalocianinas, clorofilas, Rosa de Bengala, buckminsterfullereno, 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 cuando la activación es mediante oxígeno singlete. Habitualmente, 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 producto intermedio luminiscente metaestable.

En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, el compuesto tiene la fórmula:



en la que L, p, q y r son tal como se definieron anteriormente.

En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, el compuesto tiene la fórmula:



5 en la que L, p, q y r son tal como se definieron anteriormente.

Preparación de compuestos

10 Se describen ejemplos de métodos de preparación de compuestos según los principios descritos en el presente documento, a modo de ilustración y no de limitación, con referencia a las figuras 1 y 2. Pueden emplearse otros enfoques para formar los compuestos acordes con los principios descritos en el presente documento. En referencia a la figura 1, se trata 25-OH-VD₃ (I) para formar el derivado II carbonato de succinimidilo. Por ejemplo, I puede combinarse con carbonato de disuccinimidilo en presencia de una base en un disolvente orgánico polar anhidro. La base puede ser, por ejemplo, trietilamina o diisopropiltilamina. El disolvente orgánico polar anhidro puede ser, por ejemplo, acetonitrilo, diclorometano, tetrahidrofurano (THF), dimetilformamida (DMF) o dimetilsulfóxido (DMSO). La temperatura durante la reacción es de aproximadamente 18°C a aproximadamente 25°C, o de aproximadamente

temperatura ambiente. Los reactantes se someten a agitación durante la reacción removiendo o revolviendo, por ejemplo. El periodo de tiempo de la reacción es de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 24 horas, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 21 horas, o de aproximadamente 18 horas.

5 El carbamato III (3-carbamato de 25-OH-vitamina D₃, p = 1) puede prepararse a partir del derivado II carbonato de succinimidilo, por ejemplo, combinando II con una suspensión de hemiclóridato de carboximetoxilamina (CMO) en presencia de una base en un disolvente orgánico polar anhidro. La base puede ser, por ejemplo, trietilamina o diisopropilietilamina. El disolvente orgánico polar anhidro puede ser, por ejemplo, DMF o DMSO. El recipiente de reacción que contiene los reactantes anteriores se mantiene en un baño de calentamiento a una temperatura del baño de calentamiento durante la reacción de aproximadamente 18°C a aproximadamente 25°C, o de aproximadamente 22°C. Los reactantes se someten a agitación durante la reacción removiendo o revolviendo, por ejemplo. El periodo de tiempo de la reacción es de aproximadamente 15 a aproximadamente 21 horas, o de aproximadamente 18 horas. El disolvente orgánico se retira mediante evaporación, que puede acelerarse sometiendo el contenido del recipiente de reacción a vacío. El residuo puede combinarse con un disolvente orgánico polar tal como, por ejemplo, acetato de etilo o diclorometano y entonces se lava con una disolución acuosa de una sal inorgánica tal como, por ejemplo, disolución de bicarbonato de sodio o salmuera. La fase orgánica puede secarse, por ejemplo, mezclando con una sal inorgánica anhidra tal como, sulfato de sodio o sulfato de magnesio, por ejemplo. Tras el secado, la fase orgánica puede tratarse para separar cualquier material sólido sometiendo la fase orgánica, por ejemplo, a filtración o decantación. El disolvente orgánico se retira mediante evaporación, que puede acelerarse sometiendo el contenido del recipiente de reacción a vacío. El producto seco resultante puede purificarse mediante medios cromatográficos tales como, por ejemplo, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), cromatografía de líquidos de fase inversa (RPLC), cromatografía de líquidos de alta turbulencia (HTLC) o cromatografía de gases. El producto puede almacenarse en un disolvente orgánico polar anhidro tal como, por ejemplo, DMSO o DMF.

15 El carbamato III puede activarse para acoplarse a un grupo de unión de un soporte sólido tal como, por ejemplo, una partícula. En un ejemplo según los principios descritos en el presente documento, el carbamato III se activa mediante la formación del éster de sulfo-NHS IV. La reacción se lleva a cabo combinando el carbamato III con un agente de activación tal como, por ejemplo, sulfo-NHS, en presencia de, por ejemplo, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) en un medio orgánico polar anhidro tal como, por ejemplo, DMSO, a una temperatura de aproximadamente 15°C a aproximadamente 40°C, o de aproximadamente 20°C a aproximadamente 30°C, o a temperatura ambiente durante un periodo de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 25 horas, o de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 20 horas, o de aproximadamente 18 horas. El medio se somete a agitación tal como mediante rotación o agitación, por ejemplo.

25 En referencia a la figura 2, se prepara una partícula tal como, por ejemplo, una partícula de látex (designada EPRM en este ejemplo) que tiene incorporado en ella un compuesto quimioluminiscente (colorante) y que tiene una capa interior de aminodextrano y una capa exterior de dextranaldehído mediante un procedimiento similar al descrito en la patente estadounidense n.º 7.179.660. Los grupos aldehído en la capa exterior de dextranaldehído se hacen reaccionar con etilendiamina en condiciones de aminación reductora para formar el reactivo V (EPRM-EDA), que es un reactivo de partículas que tiene restos colgantes que comprenden una cadena de etileno y un grupo amina terminal. Las condiciones de aminación reductora incluyen el uso de un agente reductor tal como, por ejemplo, un hidruro metálico (por ejemplo, borohidruro de sodio o borohidruro de potasio), cianoborohidruro de sodio o triacetoxiborohidruro de sodio. La reacción se lleva a cabo en un medio acuoso a una temperatura durante la reacción de aproximadamente 20°C a aproximadamente 100°C, o de aproximadamente 30°C a aproximadamente 50°C, durante un periodo de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 48 horas, o de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 24 horas. El punto de enlace de los restos colgantes con la capa exterior de dextranaldehído comprende un enlace de amina.

35 El éster de sulfo-NHS IV (en un disolvente orgánico polar anhidro tal como, por ejemplo, DMSO o DMF) se combina con el reactivo de partículas V (en un disolvente orgánico polar anhidro tal como, por ejemplo, DMSO o DMF, con un tensioactivo tal como, por ejemplo, GAFAC® o TWEEN® 20). La mezcla de reacción se somete a agitación, por ejemplo, removiendo o revolviendo. La temperatura durante la reacción es de aproximadamente 18°C a aproximadamente 25°C, o de aproximadamente temperatura ambiente. Los reactantes se someten a agitación durante la reacción removiendo o revolviendo, por ejemplo. El periodo de tiempo de la reacción es de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 24 horas, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 21, por ejemplo. La partícula resultante (VI) puede someterse a una o más técnicas de lavado y purificación tales como, por ejemplo, diafiltración y sonicación, por ejemplo.

55 Los derivados de vitamina D₂ según los principios descritos en el presente documento pueden prepararse de una manera similar a la descrita anteriormente para la preparación de los derivados de vitamina D₃ según los principios descritos en el presente documento.

Descripción general de los ensayos para vitamina D utilizando los presentes compuestos

60 Algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento se refieren a métodos de determinación de una o ambas de la presencia y la cantidad de vitamina D en una muestra que se sospecha que contiene vitamina

combinación se somete a condiciones para la unión del compuesto al elemento de unión específico para formar un complejo, y se mide la cantidad del complejo. La cantidad del complejo está relacionada con la presencia y/o la cantidad de vitamina D en la muestra.

5 El elemento de unión específico es un miembro de un par de unión específico, que es una de dos moléculas diferentes, que tienen un área sobre la superficie o en una cavidad, que se une específicamente a, y que por tanto se define como complementaria con una organización espacial y polar particular, de la otra molécula. Los miembros del par de unión específico serán habitualmente miembros de un par inmunológico tal como antígeno-anticuerpo, aunque otros pares de unión específicos tales como biotina-avidina, hormonas-receptores de hormonas, enzima-sustrato, dúplex de ácido nucleico, IgG-proteína A, pares de polinucleótidos tales como ADN-ADN, ADN-ARN, por ejemplo, no son pares inmunológicos pero están incluidos dentro del alcance del término "miembro de sbp (de par de unión específico)".

10 La unión específica implica el reconocimiento específico de una de dos moléculas diferentes para la otra en comparación con el reconocimiento sustancialmente menor de otras moléculas. Por una parte, la unión no específica implica unión no covalente entre moléculas que es relativamente independiente de estructuras de superficie específicas. La unión no específica puede resultar de varios factores incluyendo interacciones hidrófobas entre moléculas. Parejas de unión preferidas son anticuerpos.

15 En algunos ejemplos de ensayos según los principios descritos en el presente documento, el elemento de unión específico para vitamina D es un anticuerpo frente a vitamina D, que puede ser una molécula de inmunoglobulina completa o un fragmento de la misma. Los anticuerpos incluyen diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b y IgG3 e IgM, por ejemplo. Los fragmentos de los mismos pueden incluir Fab, Fv y F(ab')₂, Fab', y similares. Además, pueden usarse agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos cuando sea apropiado, siempre que se conserve la afinidad de unión para la vitamina D. Pueden prepararse anticuerpos frente a vitamina D mediante técnicas que incluyen, pero sin limitarse a, inmunización de un huésped y recogida de sueros (policlonales), preparación de líneas celulares híbridas continuas y recogida de la proteína secretada (monoclonales) o clonación y expresión de secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de las mismas que codifican para al menos las secuencias de aminoácidos requeridas para la unión específica de anticuerpos naturales, por ejemplo.

20 La muestra que va a analizarse es una que se sospecha que contiene vitamina D. Las muestras pueden ser muestras biológicas o muestras no biológicas. Las muestras biológicas pueden proceder de un sujeto mamífero o de un sujeto no mamífero. Los sujetos mamíferos pueden ser, por ejemplo, seres humanos u otras especies de animales. Las muestras biológicas incluyen fluidos biológicos tales como sangre completa, suero, plasma, esputo, líquido linfático, semen, moco vaginal, heces, orina, líquido cefalorraquídeo, saliva, deposiciones, líquido cefalorraquídeo cerebral, lágrimas, moco, y similares; tejido biológico tal como pelo, piel, secciones o tejidos extirpados de órganos u otras partes del cuerpo; etc. En muchos casos, la muestra es sangre completa, plasma o suero. También pueden analizarse muestras no biológicas incluyendo, pero sin limitarse a, corrientes de desechos, por ejemplo, usando compuestos según los principios descritos en el presente documento.

25 La muestra puede prepararse en cualquier medio conveniente, que puede ser, por ejemplo, un medio de ensayo, que se comenta más completamente a continuación en el presente documento. En algunos casos, puede aplicarse un pretratamiento a la muestra tal como, por ejemplo, para lisar células sanguíneas. En algunos ejemplos, tal pretratamiento se realiza en un medio que no interfiera posteriormente con un ensayo.

30 La combinación en el medio se somete a condiciones para la unión del compuesto al elemento de unión específico para vitamina D para formar un complejo. Se mide la cantidad del complejo donde la cantidad del complejo está relacionada con una o ambas de la presencia y la cantidad de vitamina D en la muestra.

35 Un ensayo para vitamina D puede realizarse o bien sin separación (homogéneo) o bien con separación (heterogéneo) de cualquiera de los componentes o productos del ensayo. Los ensayos heterogéneos habitualmente implican una o más etapas de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Los inmunoensayos pueden implicar reactivos marcados o no marcados. Los inmunoensayos que implican reactivos no marcados habitualmente comprenden la formación de complejos relativamente grandes que implican uno o más anticuerpos preparados a partir de conjugados inmunogénicos según los principios descritos en el presente documento. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, métodos con inmunoprecipitina y de aglutinación y técnicas de dispersión de luz correspondientes tales como, por ejemplo, nefelometría y turbidimetría, para la detección de complejos de anticuerpo. Los inmunoensayos marcados incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayos de quimioluminiscencia, inmunoensayos enzimáticos, inmunoensayos por polarización de fluorescencia, radioinmunoensayos, ensayos de inhibición, ensayos de luminiscencia inducida y ensayos de canalización de oxígeno fluorescente, por ejemplo.

40 Un grupo general inmunoensayos incluye inmunoensayos que usan una concentración limitada de un compuesto según los principios descritos en el presente 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 compuesto según los principios descritos en el presente documento. Otro grupo de inmunoensayos incluye ensayos homogéneos libres de separación en un reactivo marcado según los principios descritos en el presente documento modula la señal del

marcador tras la unión de un compuesto según los principios descritos en el presente documento a un elemento de unión específico para vitamina D, compitiendo por tanto con la vitamina D que puede estar presente en la muestra.

Tal como se mencionó anteriormente, los ensayos pueden realizarse o bien sin separación (homogéneo) o bien con separación (heterogéneo) de cualquier componente o producto del ensayo. Los inmunoensayos homogéneos se ejemplifican mediante el ensayo EMIT® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, IL) dado a conocer en Rubenstein, *et al.*, patente estadounidense n.º 3.817.837, de la columna 3, línea 6 a la columna 6, línea 64; métodos de inmunofluorescencia tales como los dados a conocer en Ullman, *et al.*, patente estadounidense n.º 3.996.345, de la columna 17, línea 59, a la columna 23, línea 25; inmunoensayos de canalización enzimática ("ECIA") tales como los dados a conocer en Maggio, *et al.*, patente estadounidense n.º 4.233.402, de la columna 6, línea 25 a la columna 9, línea 63; el inmunoensayo por polarización de fluorescencia ("FPIA") tal como se da a conocer por ejemplo en, entre otros, la patente estadounidense n.º 5.354.693; e inmunoensayos enzimáticos tales como el ensayo de inmunoadsorción unido a enzimas ("ELISA"). Ejemplos de ensayos heterogéneos son el radioinmunoensayo, dado a conocer en Yalow, *et al.*, J. Clin. Invest. 39:1157 (1960).

Otros inmunoensayos enzimáticos son el inmunoensayo mediado por modulación enzimática ("EMMIA") comentado por Ngo y Lenhoff, FEBS Lett. (1980) 116:285-288; el inmunoensayo de fluorescencia con sustrato marcado ("SLFIA") dado a conocer por Oellerich, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. (1984) 22:895-904; los inmunoensayos de donador enzimático combinado ("CEDIA") dados a conocer por Khanna, *et al.*, Clin. Chem. Acta (1989) 185:231-240; inmunoensayos homogéneos con partículas marcadas tales como inmunoensayos de inhibición turbidimétricos potenciados con partículas ("PETINIA"), inmunoensayo turbidimétrico potenciado con partículas ("PETIA"); el formato de ensayo de inmunoensayo de afinidad mediado por dióxido de cromo ("ACMIA"), que se describen en las patentes estadounidenses n.ºs 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 5.434.051.

Otros ensayos incluyen ensayos con marcador de éster de acridinio tales como los comentados en las patentes estadounidenses n.ºs 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 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 enzimáticos de membrana ("EMIA"); y los luminoinmunoensayos ("LIA"). Otros tipos de ensayos incluyen ensayos de inmunosensor que implican la monitorización de los cambios en las propiedades ópticas, acústicas y eléctricas del presente conjugado tras la unión del analito de vitamina D. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunosensor óptico, ensayos de inmunosensor acústico, ensayos de inmunosensor semiconductor, ensayos de inmunosensor transductor electroquímico, ensayos de inmunosensor potenciométrico, ensayos de electrodo amperométrico.

Los ensayos heterogéneos habitualmente implican una o más etapas de separación y pueden ser competitivos o no competitivos. Se dan a conocer una variedad de formatos de ensayo heterogéneo competitivo y no competitivo en Davalian, *et al.*, patente estadounidense n.º 5.089.390, de la columna 14, línea 25 a la columna 15, línea 9. En un ejemplo de un ensayo heterogéneo competitivo, se pone en contacto un soporte que tiene un anticuerpo frente a vitamina D unido al mismo con un medio que contiene la muestra que se sospecha que contiene vitamina D y un compuesto marcado según los principios descritos en el presente documento. La vitamina D en la muestra compete, para la unión al anticuerpo frente a vitamina D, con el compuesto según los principios descritos en el presente documento que porta un marcador detectable. Tras separar el soporte y el medio, se determina la actividad de marcador del soporte o del medio mediante técnicas convencionales y está relacionada con la cantidad de analito de vitamina D en la muestra. En una variación del ensayo heterogéneo competitivo anterior, el soporte comprende un compuesto marcado según los principios descritos en el presente documento como reactivo marcado y el anticuerpo frente a vitamina D comprende un marcador.

En algunos ejemplos, se combina una muestra que va a analizarse en un medio de ensayo con un anticuerpo frente a vitamina D y el compuesto marcado según los principios descritos en el presente documento. El medio se examina para determinar una o ambas de la presencia y la cantidad de un complejo que comprende el compuesto marcado y el anticuerpo frente a vitamina D, donde la presencia y/o la cantidad de tales complejos indica la presencia y/o la cantidad de vitamina D en la muestra.

En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, la muestra que va a analizarse se somete a un pretratamiento para liberar vitamina D de sustancias de unión endógenas tales como, por ejemplo, proteínas plasmáticas o séricas que se unen a vitamina D. La liberación de vitamina D 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 usados secuencialmente. El agente de digestión es uno que descompone las sustancias de unión endógenas de modo que ya no puedan unirse a 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 (dodecilsulfato de sodio, por ejemplo). Los agentes de liberación para liberar vitamina D de sustancias de unión endógenas incluyen, a modo de ilustración y no de limitación, agentes desnaturizantes ácidos tales como, por ejemplo, ácido salicílico, warfarina, ácidos sulfónicos, ácidos toluenosulfónicos, ácido naftalenosulfónico, ácido anilina-naftalenosulfónico (ANS) (incluyendo, por ejemplo, ácido 1-

anilinoftaleno-8-sulfónico (1,8-ANS) y ácido 8-anilinoftaleno-1-sulfónico (8-ANS)), ácidos salicílicos y derivados de los anteriores.

5 Las condiciones tales como, por ejemplo, duración, temperatura, pH y 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
 10 unión endógenas, de la naturaleza de la muestra y de la naturaleza del agente de liberación, por ejemplo. En general, las condiciones son suficientes para lograr la función o efecto deseado. En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, una concentración eficaz 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 de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg/ml, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/ml, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 mg/ml, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 mg/ml. El pretratamiento de la muestra para liberar vitamina D de sustancias de unión endógenas puede llevarse a cabo como una etapa independiente antes de realizar un ensayo o como primera etapa en un ensayo. En cualquier caso, puede requerirse uno o más reactivos para detener la acción del agente de digestión y/o el agente de liberación. Las condiciones para realizar

15 Las condiciones para realizar los ensayos incluyen llevar a cabo el ensayo en un medio acuoso tamponado a un pH moderado, generalmente el que proporciona una sensibilidad de ensayo óptima. El medio acuoso puede ser únicamente agua o puede incluir desde el 0,1 hasta aproximadamente el 40 por ciento en volumen de un codisolvente. El pH para el medio estará en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11, o en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, o en el intervalo de aproximadamente 6,5 a
 20 aproximadamente 9,5, por ejemplo. El pH será habitualmente un compromiso entre la unión óptima de los elementos de unión de cualquier par de unión específicos, el pH óptimo para otros agentes del ensayo tales como los miembros del sistema de producción de señales, etc. Pueden usarse diversos tampones para lograr el pH deseado y mantener el pH durante el ensayo. Los tampones 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 tampón particular empleado no es crítico, pero en un ensayo individual puede preferirse un tampón u otro.

En los métodos de ensayo pueden emplearse diversos materiales auxiliares. Por ejemplo, además de los tampones, el medio puede comprender estabilizadores para el medio y para los reactivos empleados. En algunas realizaciones, además de estos aditivos, pueden incluirse proteínas tales como, por ejemplo, albúminas; disolventes orgánicos tales como, por ejemplo, formamida; sales de amonio cuaternario; polianiones tales como, por ejemplo, sulfato de dextrano; potenciadores de unión, por ejemplo, polialquilenglicoles; polisacáridos tales como, por ejemplo, dextrano o trehalosa. El medio también puede comprender agentes para impedir la formación de coágulos sanguíneos. Tales agentes se conocen bien 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 limitarse a, azida sódica, sulfato de nemocina, PROCLIN® 300, estreptomina, por ejemplo. El medio puede comprender adicionalmente uno o más
 30 tensioactivos. Cualquiera de los materiales anteriores, si se emplea, está presente en una concentración o cantidad suficiente para lograr la función o efecto deseado.

Puede aplicarse uno o más periodos de incubación al medio en uno o más intervalos incluyendo cualquier intervalo entre adiciones de diversos reactivos empleados en un ensayo incluyendo los mencionados anteriormente. El medio se incuba habitualmente a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que se produzca la unión de
 40 diversos componentes de los reactivos y la unión de la vitamina D en la muestra. Normalmente se emplean temperaturas moderadas para llevar a cabo el método y habitualmente temperatura constante, preferiblemente, temperatura ambiente, durante el periodo de la medición. En algunos ejemplos, las temperaturas de incubación oscilan entre aproximadamente 5° y aproximadamente 99°C, o entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 70°C, o entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 45°C, por ejemplo. El periodo 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 periodo de tiempo depende de la temperatura del medio y de la velocidad de unión de los diversos reactivos, que se determina por la constante de velocidad de asociación, la concentración, la constante de unión y la constante de velocidad de disociación.

50 En un ejemplo de un método para determinar vitamina D en una muestra que se sospecha que contiene vitamina D, se proporciona una combinación en un medio donde la combinación incluye la muestra, un agente de liberación (si la muestra no se ha tratado previamente para liberar vitamina D de sustancias de unión endógenas), un anticuerpo frente a vitamina D, y un compuesto marcado según los principios descritos en el presente documento donde el marcador es un marcador de poli(aminoácido) o un marcador distinto de poli(aminoácido). El medio se examina para determinar una o ambas de la presencia y la cantidad de uno o ambos de un complejo que comprende vitamina D y el anticuerpo frente a vitamina D o un complejo que comprende el compuesto marcado y anticuerpo frente a vitamina D. La presencia y/o la cantidad de uno o ambos de los complejos indica la presencia y/o la cantidad de vitamina D en la muestra.

60 Algunos ensayos conocidos utilizan un sistema de producción de señales (sps) que emplea miembros del sps primero y segundo. La designación "primero" y "segundo" es completamente arbitraria y no significa ni sugiere ningún orden o clasificación entre los miembros del sps ni ningún orden de adición de los miembros del sps en los

presentes métodos. Los miembros del sps pueden referirse a que la activación de un miembro del sps produce un producto tal como, por ejemplo, luz o un producto activado, que da como resultado activación de otro miembro del sps.

5 En algunas realizaciones de ensayos, los miembros del sps comprenden un sensibilizador tal como, por ejemplo, un fotosensibilizador, y una composición quimioluminiscente donde la activación del sensibilizador da como resultado un producto que activa la composición quimioluminiscente. El segundo miembro del sps habitualmente genera una señal detectable que está relacionada con la cantidad de miembro del sps unido y/o no unido, es decir, la cantidad de miembro del sps unido o no unido al analito de vitamina D que está detectándose o a un compuesto según los principios descritos en el presente documento. En algunos ejemplos según los principios descritos en el presente documento, uno de o bien el reactivo de sensibilizador o bien el reactivo quimioluminiscente comprende el presente reactivo de compuesto.

10 En un ejemplo particular, puede emplearse un inmunoensayo de luminiscencia inducida. Se hace referencia al inmunoensayo de luminiscencia inducida en la patente estadounidense n.º 5.340.716 (Ullman). En un enfoque, el ensayo usa una partícula que tiene asociado con ella un fotosensibilizador donde un compuesto según los principios descritos en el presente documento se une a la partícula (reactivo de compuesto-partícula). El reactivo quimioluminiscente comprende un anticuerpo frente a vitamina D. El analito de vitamina D compite con el reactivo de compuesto-partícula para unirse al anticuerpo frente a vitamina D. Si el analito de vitamina D está presente, es menor el número de moléculas de reactivo de compuesto-partícula que entra en estrecha proximidad con el reactivo quimioluminiscente. Por tanto, habrá una disminución en la señal de ensayo. El fotosensibilizador genera oxígeno singlete y activa el reactivo quimioluminiscente cuando los dos marcadores están en estrecha proximidad. El reactivo quimioluminiscente activado produce luz posteriormente. La cantidad de luz producida está relacionada con la cantidad del complejo formado, que a su vez está relacionada con la cantidad de analito de vitamina D presente en la muestra.

15 En otro ejemplo particular de un inmunoensayo de luminiscencia inducida, el ensayo usa una partícula que tiene asociado con ella un compuesto quimioluminiscente donde un compuesto según los principios descritos en el presente documento se une a la partícula (reactivo de compuesto-partícula). El reactivo fotosensibilizador comprende un anticuerpo frente a vitamina D. El analito de vitamina D compite con el reactivo de compuesto-partícula para unirse al anticuerpo frente a vitamina D. Si el analito de vitamina D está presente, es menor el número de moléculas de reactivo de compuesto-partícula que entran en estrecha proximidad con el reactivo fotosensibilizador. Por tanto, habrá una disminución en la señal de ensayo. El fotosensibilizador genera oxígeno singlete y activa el compuesto quimioluminiscente del reactivo de compuesto-partícula cuando los dos marcadores están en estrecha proximidad. El compuesto quimioluminiscente activado produce luz posteriormente. La cantidad de luz producida está relacionada con la cantidad del complejo formado, que a su vez está relacionada con la cantidad de analito de vitamina D presente en la muestra.

20 En otro ejemplo particular de un ensayo de luminiscencia inducida, se emplea una partícula fotosensibilizadora que se conjuga con una pareja de unión para una molécula pequeña tal como, por ejemplo, avidina o estreptavidina (que son parejas de unión para biotina). También se emplea un compuesto según los principios descritos en el presente documento que comprende biotina (reactivo de biotina-compuesto). Se emplea un reactivo quimioluminiscente que comprende un elemento de unión específico para vitamina D como parte del sistema de detección. El medio de reacción se incuba para permitir que la avidina o estreptavidina de las partículas fotosensibilizadoras se una al reactivo de biotina-compuesto en virtud de la unión entre avidina y biotina y también para permitir que el elemento de unión específico para la vitamina D que forma parte del reactivo quimioluminiscente se una al analito de vitamina D o al compuesto según los principios descritos en el presente documento que ahora está unido a las partículas fotosensibilizadoras. Entonces, se irradia el medio con luz para excitar el fotosensibilizador que, en su estado excitado, puede activar oxígeno para dar un estado singlete. Puesto que ahora menos cantidad del reactivo quimioluminiscente está en estrecha proximidad con el fotosensibilizador debido a la presencia del analito de vitamina D, hay menos activación del reactivo quimioluminiscente por el oxígeno singlete y menos luminiscencia. Entonces se examina el medio para determinar la presencia y/o la cantidad de luminiscencia o luz emitida, cuya presencia está relacionada con la presencia y/o la cantidad del analito de vitamina D, donde se observa una disminución en la señal en presencia del analito de vitamina D.

25 En otro ejemplo particular de un ensayo de luminiscencia inducida, se emplea una partícula fotosensibilizadora que se conjuga con una pareja de unión para una molécula pequeña tal como, por ejemplo, avidina o estreptavidina (que son parejas de unión para biotina). Un reactivo de conjugado comprende un elemento de unión específico para vitamina D conjugado con biotina. También se emplea un compuesto según los principios descritos en el presente documento donde el compuesto está unido a una partícula quimioluminiscente (reactivo de compuesto-quimioluminiscente). Se incuba el medio de reacción para permitir que la avidina o estreptavidina de las partículas fotosensibilizadoras se unan al reactivo de biotina-anticuerpo en virtud de la unión entre avidina y biotina y también para permitir que el elemento de unión específico para la vitamina D se una a la vitamina D si está presente en la muestra y al compuesto según los principios descritos en el presente documento que forma parte del reactivo de compuesto-quimioluminiscente. Entonces se irradia el medio con luz para excitar el fotosensibilizador que, en su estado excitado, puede activar oxígeno para dar un estado singlete. Puesto que ahora menos cantidad del reactivo de compuesto-quimioluminiscente está en estrecha proximidad con el fotosensibilizador debido a la presencia del

analito de vitamina D, hay menos activación del reactivo quimioluminiscente por el oxígeno singlete y menos luminiscencia. Entonces se examina el medio para determinar la presencia y/o la cantidad de luminiscencia o luz emitida, estando relacionada la presencia de la misma con la presencia y/o la cantidad del analito de vitamina D, donde se observa una disminución en la señal en presencia del analito de vitamina D.

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

20 Otro ejemplo de un ensayo para vitamina D según los principios descritos en el presente documento es un inmunoensayo con marcador de éster de acridinio que usa partículas paramagnéticas como fase sólida (inmunoensayo ADVIA). El sistema de detección empleado para este ejemplo de un ensayo de vitamina D incluye una vitamina D marcada con una molécula pequeña (resto de captura) como conjugado de molécula pequeña o conjugado de captura, pareja de unión para las partículas de látex paramagnéticas recubiertas con la molécula
25 pequeña como fase sólida (SP), y un anticuerpo marcado con éster de acridinio frente a vitamina D (anticuerpo de detección). La molécula pequeña puede ser, por ejemplo, biotina o fluoresceína y la pareja de unión respectiva puede ser estreptavidina o anticuerpo frente a fluoresceína. La vitamina D puede unirse a la molécula pequeña directamente o a través de un grupo de unión tal como, por ejemplo, una proteína, por ejemplo, albúmina sérica bovina (BSA). La vitamina D en una muestra de paciente compite con la vitamina D del resto de captura para unirse
30 al anticuerpo de detección anti-vitamina D marcado con éster de acridinio. La muestra que se sospecha que contiene vitamina D se somete a un pretratamiento con 1,8-ANS. El ensayo puede llevarse a cabo en un aparato Centaur@ CP (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark DE) según las directrices del fabricante suministradas con el mismo.

Otro ejemplo de un ensayo para vitamina D según los principios descritos en el presente documento es un
35 inmunoensayo con marcador de éster de acridinio que usa partículas paramagnéticas como fase sólida (inmunoensayo ADVIA). El sistema de detección empleado para este ejemplo de un ensayo de vitamina D incluye un anticuerpo frente a vitamina D marcado con una molécula pequeña (anticuerpo de captura) como conjugado de biotina o conjugado de captura, partículas de látex paramagnéticas recubiertas con estreptavidina como fase sólida (SP) y vitamina D marcada con éster de acridinio (hapteno de detección). El marcador de éster de acridinio puede
40 unirse directamente a la vitamina D para formar el hapteno de detección o puede emplearse un grupo de unión que incluye, por ejemplo, una proteína tal como, por ejemplo, BSA. La vitamina D en una muestra de paciente compite con el hapteno de detección marcado con éster de acridinio para unirse con el anticuerpo anti-vitamina D. La muestra que se sospecha que contiene vitamina D se somete a un pretratamiento con 1,8-ANS. El ensayo puede llevarse a cabo en un aparato Centaur@ XP o Centaur@ CP (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.,
45 Newark DE) según las directrices del fabricante suministradas con el mismo. En variaciones de los ensayos con éster de acridinio anteriores, la molécula pequeña puede ser, por ejemplo, biotina o fluoresceína.

La concentración del analito de vitamina D en una muestra que puede someterse a ensayo varía generalmente desde aproximadamente 10^{-5} hasta aproximadamente 10^{-17} M, o desde aproximadamente 10^{-6} hasta
50 aproximadamente 10^{-4} M, por ejemplo. Consideraciones tales como si el ensayo es cualitativo, semicuantitativo o cuantitativo (en relación con la cantidad del analito de vitamina D presente en la muestra), la técnica de detección particular y la concentración esperada del analito de vitamina D, normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

Las concentraciones de los diversos reactivos en el medio de ensayo se determinarán generalmente por el intervalo de concentración de interés del analito de vitamina D, la naturaleza del ensayo, y similares. Sin embargo, la
55 concentración final de cada uno de los reactivos normalmente se determina de manera empírica para optimizar la sensibilidad del ensayo en el intervalo de interés. Es decir, una variación en la concentración de analito de vitamina D que es importante debe proporcionar una diferencia de señal medible con precisión. Consideraciones tales como la naturaleza del sistema de producción de señales y la naturaleza de los analitos normalmente determinan las concentraciones de los diversos reactivos.

60 Tal como se mencionó anteriormente, la muestra y los reactivos se proporcionan en combinación en el medio. Aunque puede variarse el orden de adición al medio, habrá preferencias determinadas para algunas realizaciones de

los formatos de ensayo descritos en el presente documento. Naturalmente, el orden de adición más sencillo es añadir todos los materiales simultáneamente y determinar el efecto que tiene el medio de ensayo sobre la señal como en un ensayo homogéneo. Alternativamente, cada uno de los reactivos, o grupos de reactivos, pueden combinarse secuencialmente. En algunas realizaciones, puede estar implicada una etapa de incubación posterior a cada adición tal como se comentó anteriormente. En ensayos heterogéneos, también pueden emplearse etapas de lavado después de una o más etapas de incubación.

Etapa de examen

En una etapa siguiente de un método de ensayo, se examina el medio para determinar la presencia de un complejo que comprende el analito de vitamina D y anticuerpo frente a vitamina D y/o un complejo que comprende un reactivo de compuesto según los principios descritos en el presente documento y anticuerpo frente a vitamina D. La presencia y/o la cantidad de uno o ambos de los complejos indica la presencia y/o la cantidad del analito de vitamina D en la muestra.

La expresión “medir la cantidad de un analito de vitamina D” se refiere a la determinación cuantitativa, semicuantitativa y cualitativa de vitamina D. Se considera que los métodos que son cuantitativos, semicuantitativos y cualitativos, así como el resto de los métodos para determinar el analito de vitamina D, son métodos de medición de la cantidad del analito de vitamina D. Por ejemplo, se considera que un método que simplemente detecta la presencia o ausencia del analito de vitamina D en una muestra que se sospecha que contiene el analito de vitamina D, está incluido dentro del alcance de la presente invención. Los términos “detectar” y “determinar,” así como otros sinónimos comunes para la medición, se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

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

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

La luminiscencia o luz producida a partir de cualquier marcador puede medirse de manera visual, fotográfica, actinométrica, espectrofotométrica, tal como mediante el uso de un fotomultiplicador o un fotodiodo, o mediante cualquier otro medio conveniente para determinar la cantidad del mismo, que está relacionada con la cantidad de analito de vitamina D en el medio. El examen para determinar la presencia y/o la cantidad de la señal también incluye la detección de la señal, que en general es simplemente una etapa en la que se lee la señal. La señal normalmente se lee usando un instrumento, cuya naturaleza depende de la naturaleza de la señal. El instrumento puede ser, pero no se limita a, un espectrofotómetro, fluorímetro, espectrómetro de absorción, luminómetro y quimioluminómetro, por ejemplo.

Kits que comprenden reactivos para realizar ensayos

Un reactivo que comprende un compuesto según los principios descritos en el presente documento unido a un miembro de un sistema de producción de señales, que también puede comprender un soporte y otros reactivos para realizar un ensayo particular para un analito de vitamina D, puede estar presente en un kit útil para realizar convenientemente un ensayo para la determinación de un analito de vitamina D. En algunas realizaciones, un kit comprende en combinación envasada, una pareja de unión de biotina tal como, por ejemplo, avidina o estreptavidina, asociada con una partícula, un compuesto biotinilado según los principios descritos en el presente documento y un anticuerpo frente al analito de vitamina D marcado. El kit puede incluir además otros reactivos para realizar el ensayo, cuya la naturaleza depende del formato de ensayo particular.

Los reactivos pueden estar cada uno en recipientes independientes o diversos reactivos pueden combinarse en uno o más recipientes dependiendo de la reactividad cruzada y de la estabilidad de los reactivos. El kit puede incluir además otros reactivos envasados independientemente para realizar un ensayo, tales como elementos de par de unión específicos adicionales, elementos de sistema de producción de señales y reactivos auxiliares, por ejemplo.

Las cantidades relativas de los diversos reactivos en los kits pueden variarse ampliamente para proporcionar concentraciones de los reactivos que optimicen sustancialmente las reacciones que es necesario que se produzcan durante los presentes métodos y además para optimizar sustancialmente la sensibilidad de un ensayo. En circunstancias apropiadas, uno o más de los reactivos en el kit pueden proporcionarse como un polvo seco, habitualmente liofilizado, incluyendo excipientes, que en disolución proporcionarán una disolución de reactivo que tiene las concentraciones apropiadas para realizar un método o ensayo usando un reactivo de compuesto según los principios descritos en el presente documento. El kit puede incluir además una descripción por escrito de un método que utiliza reactivos que incluyen un reactivo de compuesto según los principios descritos en el presente documento.

La expresión “al menos” tal como se usa en el presente documento significa que el número de elementos especificados puede ser igual que el número citado. La expresión “aproximadamente” tal como se usa en el presente documento significa que el número citado puede diferir en más o menos el 10%; por ejemplo, “aproximadamente 5” significa un intervalo de 4,5 a 5,5.

- 5 La siguiente descripción se refiere a ejemplos específicos según los principios descritos en el presente documento a modo de ilustración y no de limitación; no se pretende que los ejemplos específicos limiten 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 el alcance de la presente divulgación.

Ejemplos

- 10 A menos que se indique de otro modo, los materiales de los experimentos a continuación pueden adquirirse de Sigma-Aldrich Chemical Corporation (St. Louis MO) o Fluka Chemical Corporation (Milwaukee WI). Las partes y los porcentajes divulgados en el presente documento son en peso/volumen a menos que se indique de otro modo.

Definiciones:

mg = miligramo

- 15 g = gramo(s)

ng = nanogramo(s)

ml = mililitro(s)

μl = microlitro(s)

μmol = micromolar

- 20 °C = grados centígrados

min = minuto(s)

s = segundo(s)

h = hora(s)

p/v = peso/volumen

- 25 CCF = cromatografía en capa fina

HPLC = cromatografía de líquidos de alta resolución

EtOAc = acetato de etilo

DMF = dimetilformamida

DMSO = dimetilsulfóxido

- 30 MeOP = 1-metoxi-2-propanol

MES = ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico

DI = destilada

UPA = Ultra-analizador de partículas

LOCI = inmunoensayo de canalización de oxígeno luminiscente

- 35 BSA = albúmina sérica bovina

BGG = gamma-globulina bovina

mIgG = inmunoglobulina de ratón

EM = espectrometría de masas

Preparación de perlas de EPRM-EDA

Se añaden 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 estadounidense n.º 7.179.660 y el compuesto quimioluminiscente es 2-(4-(N,N, di-tetradecil)-anilino-3-feniltioxeno con quelato de europio. Se combina EDA (800 mg, 890 µl) con 10 ml de tampón MES, pH 6 (el "tampón") y aproximadamente 4,2 ml de HCl 6 N. El pH de la mezcla es, o se ajusta para que sea, de aproximadamente 6,9. Se añade la disolución de EDA a las perlas de EPRM con agitación con vórtex y la mezcla se agita mediante oscilación a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se combina cianoborohidruro de sodio (400 mg) en un vial de 15 ml con 10 ml de agua DI y se añade la combinación a la mezcla de perlas desde arriba. Se agita la mezcla a 37°C durante 18-20 horas. Se transfieren las perlas a seis tubos de centrífuga de 40 ml. Se añade tampón MES hasta enrasar a 35 ml y se centrifuga la mezcla a 19.000 rpm durante 30 min. Se decanta el sobrenadante y se resuspenden las perlas en 2 ml del tampón con una varilla de agitación y se añade tampón adicional hasta 35 ml. Se sónica la mezcla a una potencia de 18 vatios durante 30 s, usando hielo para mantener fría la mezcla. La etapa de lavado/sonicación se realiza 4 veces para retirar todos los productos químicos de activación. Tras la última centrifugación del tampón MES, se añaden 2 ml del tampón que contiene MeOP al 5% y Tween® 20 al 0,1% (el "segundo tampón") a los tubos para la etapa de resuspensión. Se añade segundo tampón adicional hasta 35 ml antes de la sonicación. Se centrifuga la suspensión de perlas a 19.000 rpm durante 30 min. Se descarta el sobrenadante. La sonicación usó 12 ml del segundo tampón en cada tubo para dar una dilución de 25 mg/ml. El tamaño de partícula es de 277 nm tal como se determina en un instrumento UPA.

La perla quimioluminiscente de EPRM se prepara de manera similar al método descrito en la patente estadounidense n.º 6.153.442 y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20050118727A. La perla quimioluminiscente de EPRM comprende una capa interior de aminodextrano y una capa exterior de dextranaldehído que tiene funcionalidades de aldehído libres. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 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 periodo de aproximadamente 16 a aproximadamente 64 horas a un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,0, o de aproximadamente 6, en un medio acuoso tamponado empleando un tampón adecuado tal como, por ejemplo, MES. La reacción se extingue mediante la adición de un agente de extinción adecuado tal como, por ejemplo, hemiclrorhidrato de carboximetoxiamina (CMO), y lavado posterior de las partículas.

Los grupos aldehído en la capa exterior de dextranaldehído se hacen reaccionar con etilendiamina en condiciones de aminación reductora para formar el reactivo EPRM-EDA que tiene restos colgantes que comprende una cadena de etileno y un grupo amina 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 periodo de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 48 horas.

Síntesis de 3-carbamato de 25-OH-vitamina D₃ (3-carbamato de 25-OH-vitamina D₂)

En referencia a la figura 1, se agitó una mezcla de 22 mg (55 µmol) de 25-OH-VD₃ (I) adquirida de ChemReagents.com, Sugarland TX, 100 mg (420 µmol) de carbonato de disuccinimidilo (DSC), 100 µl de trietilamina en 1 ml de acetonitrilo anhidro en un matraz de 5 ml (cubierto con papel de aluminio) a temperatura ambiente durante 18 h bajo nitrógeno para preparar 25-OH-VD₃ activada (II). La CCF (EtOAc:hexano = 2:1) mostró que no quedaba material de partida. Se preparó una suspensión añadiendo 150 mg de hemiclrorhidrato 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 disolución que contenía 25-OH-VD₃ activada a la suspensión de CMO con agitación, que se continuó durante otras 18 h. Se aplicó vacío para retirar los disolventes lo máximo posible (la temperatura del baño de calentamiento no debe ser mayor de 50°C). Se añadió EtOAc (25 ml) al residuo, que se lavó tres veces con 2 ml de salmuera. Se secó la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro y se filtró; se retiró el disolvente usando un rotavapor. Se obtuvo el producto en bruto (42 mg) tras el secado y se purificó mediante HPLC. Se obtuvo el producto puro (III) (p = 1) (24 mg) tras secarse con alto vacío. Se disolvió el producto en 1,2 ml de DMSO anhidro. Se transfirieron alícuotas a viales, que se mantuvieron a -70°C.

Se empleó un método similar al descrito anteriormente para preparar 3-carbamato de 25-OH-vitamina D₂ usando 25-OH-VD₂.

Síntesis de 3-succinato de 25-OH-vitamina D₃ (3-succinato de 25-OH-vitamina D₂)

Se agitó una mezcla de 14,2 mg (35,4 µmol) de 25-OH-VD₃, 8,2 mg (90 µmol) de anhídrido succínico, 8,2 mg de imidazol en 1 ml de diclorometano anhidro en un matraz de 5 ml a temperatura ambiente durante 24 h bajo nitrógeno. La CCF (EtOAc:hexano = 2:1) mostró que no quedaba material de partida. Se retiró el disolvente a vacío usando un baño de calentamiento a 50°C. Se añadió EtOAc al residuo, que entonces se lavó tres veces con 3 x 2 ml de salmuera. Se retiró la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro y se filtró. Se retiró el disolvente usando un rotavapor y se sometió el material resultante a secado con alto vacío para dar 18 mg de producto en bruto, que se confirmó que era 3-succinato de 25-OH-vitamina D₃ mediante EM.

Se empleó un método similar al descrito anteriormente para preparar 3-succinato de 25-OH-vitamina D₂ usando 25-OH-VD₂.

Acoplamiento de EPRM-EDA y 3-carbamato de 25-OH-vitamina D₃ para dar reactivo de partículas VI

En referencia a las figuras 1 y 2, se añadió carbamato III (10 µl de alícuota en DMSO preparado tal como se describió anteriormente) (0,2 mg) a un vial de 2 ml marcado 3323-064-1. Se añadieron EDAC (6,8 mg) y SNHS (9,4 mg) más 2,27 ml de DMSO seco (3 mg/ml) a un vial de 5 ml marcado EDAC/SNHS. Se añadió la disolución de EDAC/SNHS (190 µl) al vial 3323-064-1 (1 mg/ml) para preparar 3-carbamato de 25-OH-vitamina D₃ activado IV. Se permitió que la mezcla rotara a temperatura ambiente durante 18 h. Se diluyó una alícuota de 0,4 ml de una disolución de tensioactivo GAFAC® al 16% (GAF Corporation, Wayne NJ) (0,15%) hasta el 1,6% con 3,6 ml de agua DI.

Se combinaron vitamina D₃ (8,5 mg) y 850 µl de DMSO (10 mg/ml). A un matraz de fondo redondo de 10 ml (marcado 3323-064B) equipado con una barra de agitación se le añadieron 2,0 ml (200 MG) de EPRM-EDA seguido por 400 µl (4 mg) de la disolución de vitamina D₃ anterior. Se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente.

A un matraz de fondo redondo de 10 ml (designado 3323-64A) equipado con una barra de agitación se le añadieron 2,0 ml (200 mg) de EPRM-EDA (preparado tal como se describió anteriormente) seguido por 260 µl de disolución de tensioactivo GAFAC® al 16% (0,15%) con agitación moderada. A un pequeño tubo de ensayo se le añadieron 504 µl de DMSO anhidro seguido por 60 µl (0,06 mg) de 3-carbamato de vitamina D₃ activado IV 3323-064-1 preparado tal como se describió anteriormente; y la mezcla se añadió a la mezcla de perlas EPRM-EDA. El contenido de DMSO total de la suspensión de perlas 3323-64A fue del 20%.

Al matraz de fondo redondo de 10 ml (designado 3323-064B) se le añadieron 260 µl de disolución de tensioactivo GAFAC® al 16% (0,15%) con agitación moderada. A un pequeño tubo de ensayo se le añadieron 104 µl de DMSO anhidro seguido por 60 µl (0,06 mg) de 3-carbamato de vitamina D₃ activada IV 3323-064-1. El DMSO/3-carbamato de vitamina D₃ activada IV se añadió a la mezcla de perlas. Los reactantes combinados (vitamina D₃/DMSO) más el DMSO añadido dieron un contenido de DMSO del 20% a la suspensión de perlas 3323-064B. Se permitió que los dos recipientes de reacción se agitaran durante la noche a temperatura ambiente. Entonces, se lavaron las perlas por medio de diafiltración.

Cada lote de perlas se llevó hasta 20 ml de volumen de trabajo con MeOP al 10%/GAFAC® al 1%/tampón MES pH 6. Se sometió la mezcla a diafiltración con 5 volúmenes del tampón y luego se sonicó con un sonicador de sonda a 18-21 vatios usando hielo para mantener a mezcla fría. La diafiltración/sonicación continuó a través de 50 volúmenes, tomándose muestras de efluente a 35, 40, 45 y 50 volúmenes. Se cambió el tampón a tampón de lavado de haptenos de LOCI (HEPES 50 mM, NaCl 300 mM, EDTA 1 mM, sulfato de neomicina al 0,01%, TRITON® 405X al 0,1% y PROCLIN® 300 al 0,15%, pH 7,2) usándose 10 volúmenes. Se redujo la mezcla hasta aproximadamente 7 ml y se utilizó un UPA. Los tamaños de partícula fueron 3323-064A = 289 nm y 3323-064B = 298 nm. Se determinó el porcentaje de sólidos y ambos lotes de perlas se llevaron hasta 10 mg/ml con tampón de lavado de haptenos de LOCI pH 7,2. El rendimiento fue el siguiente: 3323-064A = 160,4 mg y 3323-064B = 183,5 mg.

Acoplamiento de EPRM-EDA y 3-carbamato de 25-OH-vitamina D₂ para dar reactivo de partículas VII

De manera similar a la descrita anteriormente para la preparación del reactivo de partículas VI, se acopló 3-carbamato de 25-OH-vitamina D₂ a EPRM-EDA para dar un reactivo de partículas similar VII, que se emplea en lugar del reactivo de partículas VI en los ensayos descritos a continuación. Además, se emplea una combinación de reactivo de partículas VI y reactivo de partículas VII en lugar del reactivo de partículas VI en los ensayos descritos a continuación.

Acoplamiento de EPRM-EDA y 3-succinato de 25-OH-vitamina D₃

Se añadió 3-succinato de 25-OH-vitamina D₃ (66 µl de alícuota en DMSO preparado tal como se describió anteriormente) (2 mg) a un vial de 2 ml marcado 3323-026-1. Se añadieron EDAC (20 mg) y NHS (20 mg) más 0,8 ml de DMSO seco (25 mg/ml) a un vial de 5 ml marcado EDAC/NHS. Se añadió la disolución de EDAC/NHS (180 µl) al vial 3323-026-1 (8,1 mg/ml) para preparar 3-succinato de vitamina D₃ activado. Se permitió que la mezcla rotara a temperatura ambiente durante 18 h. A un tubo de centrifuga de 2 ml 3323-026A se le añadieron 0,5 ml (50 mg) de EPRM-EDA seguido por 1,4 ml de MES pH 6 seguido por (119 µl) (0,96 mg) de 3-succinato de vitamina D₃ activado (con agitación con vórtex durante la adición). La adición dio un contenido de DMSO del 5,9% a las perlas.

A un tubo de centrifuga de 2 ml marcado 3323-026B se le añadieron 0,5 ml (50 mg) de EPRM-EDA seguido por 1,4 ml de MES pH 6 seguido por 69 µl de DMSO más 30 µl (0,24 mg) de 3-succinato de vitamina D₃ activado (con agitación con vórtex durante la adición). La adición más el DMSO extra dio un contenido de DMSO del 5% a las perlas.

Se transfirieron mezclas a tubos de centrifuga de 40 ml. Se añadió tampón MES pH 6 que contenía MeOP al 10% y GAFAC® al 1% hasta enrasar los tubos a 35 ml. Se centrifugaron los tubos a 18.500 rpm durante 30 minutos. Se decantó el sobrenadante. Se resuspendieron las perlas en 1 ml de mezcla de tampón MES con una varilla de agitación. Se añadió más mezcla de tampón MES hasta enrasar los tubos a 35 ml. Usando hielo para mantener los

tubos fríos, se sonicaron los tubos (sonicador de sonda) a una potencia de 18-21 vatios durante 60 segundos. Se centrifugaron las perlas como anteriormente realizándose un total de cuatro lavados con tampón MES-MeOP-GAFAC®. Tras el último lavado, se resuspendieron las perlas en 1 ml de tampón de lavado de haptenos en lugar de la mezcla de tapón MES como anteriormente, realizándose dos lavados más. Se resuspendieron las perlas en 5 tampón de lavado de haptenos suficiente para dar una suspensión de 15 mg/ml. Se sonicaron las perlas a una potencia del 50% (sonicador de copa) durante 60 segundos. El tamaño de partícula se determinó en un instrumento UPA. El tamaño de partícula para 3323-26A fue de 290 nm; el tamaño de partícula para 3323-26B fue de 275 nm. El rendimiento fue el siguiente: 3323-26A = 33,2 mg y 3323-26B = 32,3 mg.

Ensayo para analito de vitamina D

10 Se llevaron a cabo ensayos en un analizador DIMENSION® VISTA® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, IL) siguiendo el protocolo para un ensayo LOCI y usando disoluciones de muestra que contenían diversas cantidades de 25-hidroxivitamina D₃ (como ejemplo de medición de vitamina D total en una muestra). En este ejemplo, el ensayo usa, como reactivo quimioluminiscente, un conjugado de partículas marcadas ("perla(s) quimioluminiscente(s)") según los principios descritos en el presente documento donde el marcador del conjugado de partículas es un compuesto quimioluminiscente contenido en una partícula de látex. Se hicieron reaccionar las 15 muestras en primer lugar con un anticuerpo biotinilado contra 25-hidroxivitamina D y luego con perlas quimioluminiscentes. Las perlas quimioluminiscentes se unen a la fracción de sitios de unión del anticuerpo monoclonal que no está ocupada por el analito de la muestra. Posteriormente, se añaden perlas de sensibilizador acoplado con estreptavidina a mezcla de reacción. Esto conduce a la formación de pares de perlas 20 quimioluminiscentes/perlas de sensibilizador cuya concentración está inversamente relacionada con la concentración de 25-hidroxivitamina D₃. Tras la iluminación a 680 nm, las perlas de sensibilizador generan oxígeno singlete que difunde al interior de las perlas quimioluminiscentes que están emparejadas con las perlas de sensibilizador, reacciona con el colorante olefínico y desencadena una señal quimioluminiscente a aproximadamente 612 nm que está inversamente relacionada con la concentración de analito.

25 La perla de estreptavidina-sensibilizador ("*sensibead(s)*") se prepara usando un método análogo al descrito en las patentes estadounidenses n.ºs 6.153.442, 7.022.529, 7.229.842 y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20050118727A. El fotosensibilizador fue bis-(trihexil)-silicio-t-butil-ftalocianina. La concentración del reactivo de perlas de sensibilizador fue de 200 µg/ml en tampón HEPES, pH 8,0 que contenía NaCl 150 mM. Se empleó el reactivo de partículas VI de EPRM-EDA-25-OH-vitamina D₃ preparado tal como se describió anteriormente 30 como "reactivo de perlas quimioluminiscentes" a una concentración de 200 µg/ml en tampón HEPES, pH 7,2, que contenía NaCl 150 mM y detergente al 0,1%.

El reactivo de anticuerpo biotinilado se prepara usando anticuerpo monoclonal específico para 25-hidroxivitamina D (anticuerpo monoclonal de oveja de Bioventix, Farnham, Surrey, RU) y biotinilando grupos amina del anticuerpo mediante reacción con NHS-PEO4-biotina (Pierce Chemical Company, Rockford IL) de manera similar a la descrita 35 en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2009/0258435A1. El reactivo de anticuerpo biotinilado se prepara en tampón HEPES pH 7,2 que contiene NaCl 150 mM y BSA 16 mg/ml, mIgG 1 mg/ml y BGG 2 mg/ml donde la concentración de reactivo de anticuerpo biotinilado es de 1000 ng/ml.

Los ensayos también se llevaron a cabo como anteriormente con la excepción de que se empleó reactivo de partículas de EPRM-EDA-succinato de 25-OH-vitamina D₃ en lugar de reactivo de partículas VI EPRM-EDA-25-OH-vitamina D₃. 40

A tiempo t = cero s, se añadieron 20 µl de reactivo de anticuerpo biotinilado y se añadieron 20 µl de agua a un recipiente de reacción. La muestra, 12 µl, se añadió 21,6 segundos después, seguido por 8 µl de agua. A t = 414,0 segundos, se añadieron 40 µl de reactivo de perlas quimioluminiscentes seguido por 20 µl de agua. Entonces se dispensó reactivo de perlas de sensibilizador a los 457,2 segundos. Las mediciones se tomaron 601,2 segundos tras 45 el inicio de la secuencia de reacción.

Los resultados se resumen en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Vitamina D (ng/ml)	kcuentas			
	3-carbamato de 25-OH-D ₃		3-succinato de 25-OH-D ₃	
	9,6 mg/g	4,8 mg/g	9,6 mg/g	4,8 mg/g
0	1118	812	414	653
2	1135	818	417	662
5	1128	813	410	654

23	1039	744	376	594
216	651	488	237	387
528	418	337	159	269

Tal como puede observarse a partir de la tabla 1, el reactivo de perlas quimioluminiscentes de 3-carbamato de 25-OH-D₃ según los principios descritos en el presente documento dio recuentos de señal superiores de manera sistemática en comparación con el reactivo de perlas quimioluminiscentes de 3-succinato de 25-OH-D₃.

- 5 Se repitió el ensayo anterior usando 3-carbamato de 25-OH-vitamina D₂ acoplado a EPRM-EDA (reactivo de partículas VII) en lugar de reactivo de partículas VI. Las disoluciones de muestra contenían diversas cantidades de 25-hidroxivitamina D₃ (como ejemplo de medición de vitamina D total en una muestra). Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 2.

Tabla 2

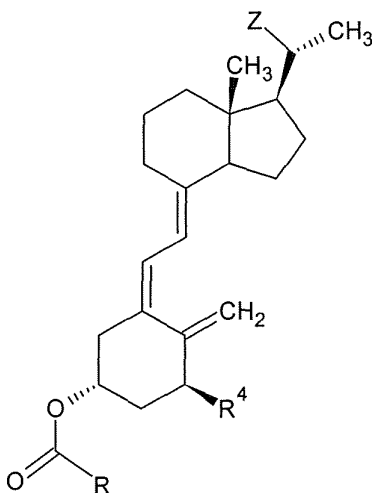
Vitamina D (ng/ml)	kcuentas			
	3-carbamato de 25-OH-D ₃		3-succinato de 25-OH-D ₃	
	9,6 mg/g	4,8 mg/g	9,6 mg/g	4,8 mg/g
0	1368	1084	414	653
2	1357	1089	417	662
5	1364	1093	410	654
23	1251	1002	376	594
216	914	716	237	387
528	658	534	159	269

- 10 Tal como puede observarse a partir de la tabla 2, el reactivo de perlas quimioluminiscentes de 3-carbamato de 25-OH-D₂ según los principios descritos en el presente documento dio recuentos de señal superiores de manera sistemática en comparación el reactivo de perlas quimioluminiscentes de 3-succinato de 25-OH-D₃.

- 15 También se repitió el ensayo anterior usando una combinación de reactivo de partículas VI y reactivo de partículas VII (50/50 en peso) en lugar de reactivo de partículas VI. Las disoluciones de muestra contienen diversas cantidades de una combinación de 25-hidroxivitamina D₃ y 25-hidroxivitamina D₂ (como ejemplo de medición de la vitamina D total en una muestra). Los resultados obtenidos son similares a los descritos anteriormente para el ensayo que emplea reactivo de partículas VI.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula:

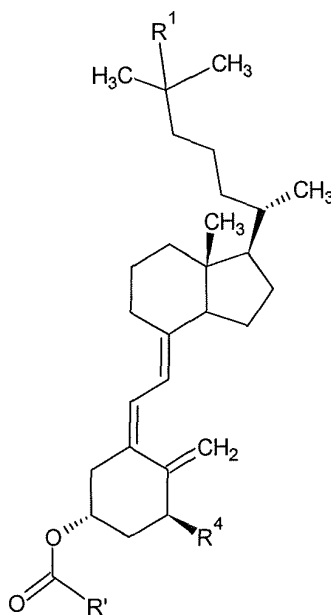


en la que:

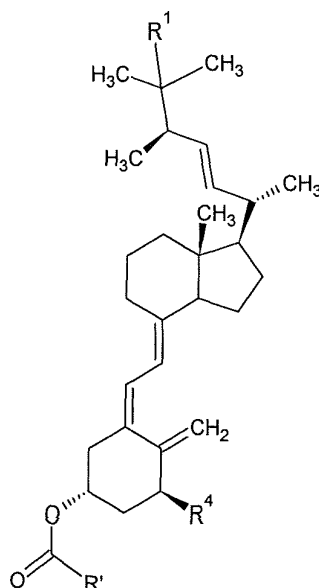
- 5 Z es un grupo alquilo, alquenilo o alquinilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, que puede estar no sustituido o uno o más de los cuales puede estar sustituido por uno o más de hidroxilo, alcoxilo inferior, oxo y oxima;
- 10 R es $-NH-O-(A)_k-R^2$, en la que R^2 es un miembro de un sistema de producción de señales, seleccionado del grupo que consiste en compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, sensibilizadores, enzimas y radiomarcadores o $-(CH_2)_nCOOH$, $-(CH_2)_mCOONHS$ (NHS es N-hidroxisuccinimida), una molécula pequeña seleccionada del grupo que consiste en biotina y fluoresceína, una pareja de unión para una molécula pequeña seleccionada del grupo que consiste en avidina, estreptavidina, anticuerpo frente a fluoresceína, anticuerpo frente a rodamina, anticuerpo frente a una molécula quimioluminiscente y anticuerpo frente a dinitrofenol, o un soporte;
- k es 0 o 1; A es un enlace cuando k es 0 y un grupo de unión cuando k es 1; n es un número entero de 1 a 5 y m es un número entero de 1 a 5; y
- 15 R^4 es H, OH o alcoxilo inferior.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que Z es un grupo alquilo ramificado o un grupo alquenilo ramificado que tiene de 4 a 10 átomos de carbono, en el que un átomo de carbono terminal del grupo alquilo ramificado o el grupo alquenilo ramificado comprende un hidroxilo.

3. Compuesto de fórmula:

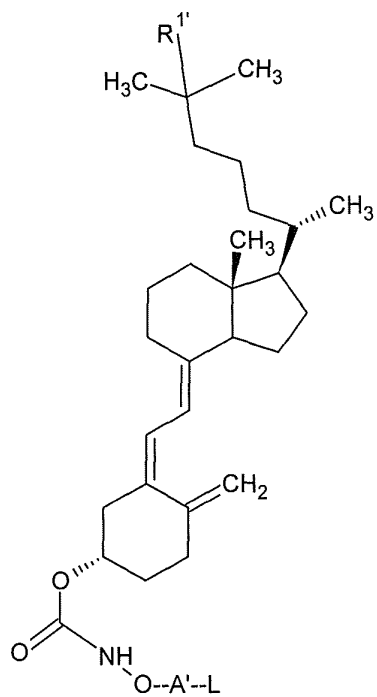


o compuesto de fórmula:

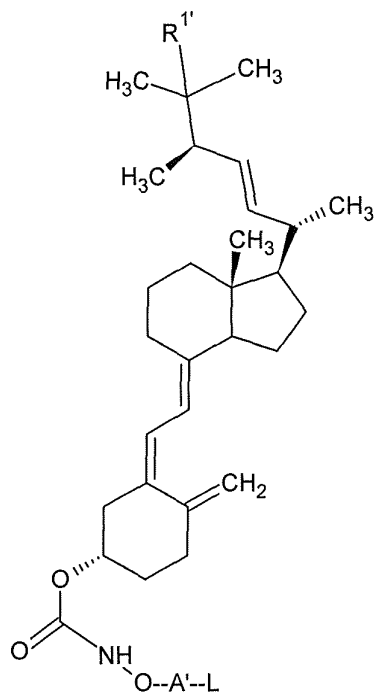


en la que:

- 5 R^1 es $-NH-O-(A)_k-R^2$, en la que R^2 es un miembro de un sistema de producción de señales, $-(CH_2)_nCOOH$, $-(CH_2)_mCOONHS$ (NHS es N-hidroxisuccinimida), una molécula pequeña seleccionada del grupo que consiste en biotina y fluoresceína, una pareja de unión para una molécula pequeña seleccionada del grupo que consiste en avidina, estreptavidina, anticuerpo frente a fluoresceína, anticuerpo frente a rodamina, anticuerpo frente a una molécula quimioluminiscente y anticuerpo frente a dinitrofenol, o un soporte;
- 10 k es 0 o 1; A es un enlace cuando k es 0 y un grupo de unión cuando k es 1; n es un número entero de 1 a 5 y m es un número entero de 1 a 5;
- R^1 es H, OH u OH protegido; y
- R^4 es H, OH o alcoxilo inferior.
- 15 4. Compuesto según la reivindicación 3, en el que R^2 es un miembro de un sistema de producción de señales seleccionado del grupo que consiste en compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, sensibilizadores, enzimas y radiomarcadores, o un miembro de un sistema de producción de señales que comprende una partícula en el que la partícula se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en partículas fluorescentes, partículas quimioluminiscentes, partículas sensibilizadoras y partículas magnéticas.
- 20 5. Método de determinación en una muestra de la presencia y/o la cantidad de vitamina D, comprendiendo el método:
- (a) proporcionar en combinación en un medio:
- (i) la muestra,
- (ii) el compuesto según la reivindicación 4, y
- (iii) un elemento de unión específico para vitamina D;
- 25 (b) someter la combinación a condiciones para la unión del compuesto según la reivindicación 1 al elemento de unión específico para formar un complejo, y
- (c) medir la cantidad del complejo, estando relacionada la cantidad del complejo con la presencia y/o la cantidad de vitamina D en la muestra.
6. Compuesto de fórmula:

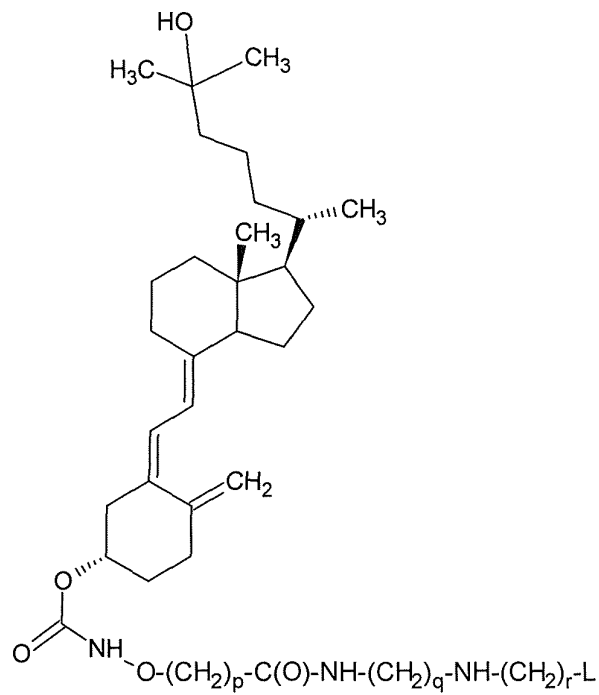


o compuesto de fórmula:

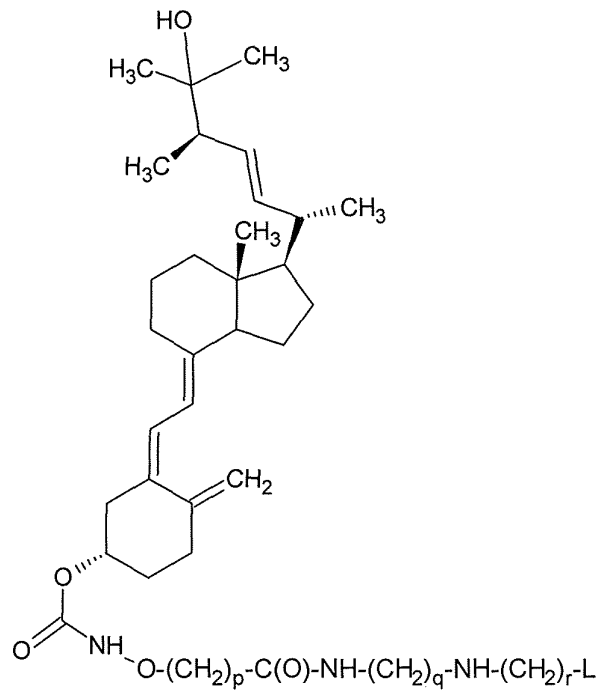


en la que:

- 5 L se selecciona del grupo que consiste en partículas magnéticas, ésteres de acridinio, una combinación de partículas magnéticas y ésteres de acridinio, partículas quimioluminiscentes y partículas sensibilizadoras; y R^{1'} es OH y A' es un enlace o un grupo de unión.
7. Compuesto según la reivindicación 6, en el que L es una partícula quimioluminiscente.
8. Compuesto según la reivindicación 6, que tiene la fórmula:



o la fórmula:



en la que:

- 5 p es un número entero de desde 1 hasta 5, q es un número entero de desde 1 hasta 5 y R es un número entero de desde 1 hasta 5.
9. Compuesto según la reivindicación 8, en el que L es una partícula quimioluminiscente.
10. Ensayo para vitamina D que comprende emplear como reactivo en el ensayo, el compuesto según la reivindicación 6.
- 10 11. Método de determinación en una muestra de la presencia y/o la cantidad de vitamina D, comprendiendo el método:
- (a) proporcionar en combinación en un medio:

- (i) la muestra,
- (ii) el compuesto según la reivindicación 8, y
- (iii) un elemento de unión específico para vitamina D;

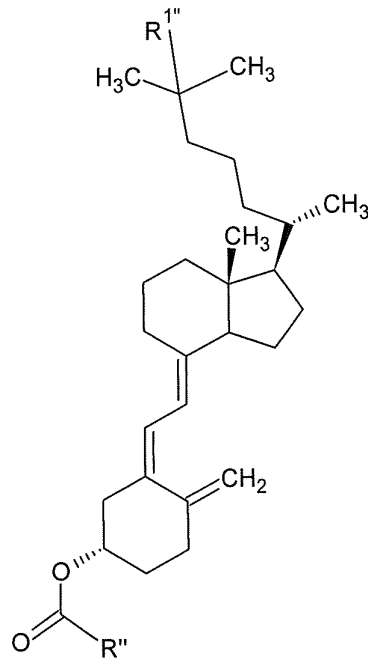
5 (b) someter la combinación a condiciones para la unión del compuesto según la reivindicación 1 al elemento de unión específico para formar un complejo, y

(c) medir la cantidad del complejo, estando relacionada la cantidad del complejo con la presencia y/o la cantidad de vitamina D en la muestra.

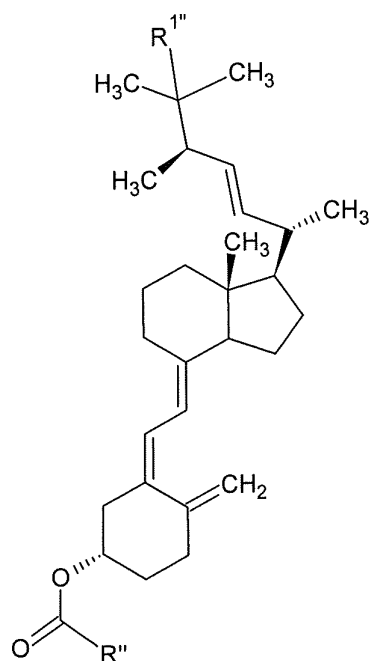
12. Método de determinación en una muestra de la presencia y/o la cantidad de vitamina D, comprendiendo el método:

10 (a) proporcionar en combinación en un medio:

- (i) la muestra,
- (ii) un compuesto de fórmula:



o un compuesto de fórmula:



en la que:

5 R^{''} es -NH-O-A''-R^{2''}, en la que R^{2''} es un miembro de un sistema de producción de señales seleccionado del grupo que consiste en compuestos fluorescentes, compuestos quimioluminiscentes, sensibilizadores, enzimas y radiomarcadores, y A'' es un enlace o un grupo de unión, y

R^{1''} es H u OH; y

(iii) un elemento de unión específico para vitamina D;

(b) someter la combinación a condiciones para la unión del compuesto al elemento de unión específico para formar un complejo, y

10 (c) medir la cantidad del complejo, estando relacionada la cantidad del complejo con la presencia y/o la cantidad de vitamina D en la muestra.

13. Método según la reivindicación 12, en el que A'' es -(CH₂)_p-C(O)-(W)_b-(CH₂)_q-(X)_c-(CH₂)_r- en la que W y X son cada uno independientemente -NH- o -O-, b y c son cada uno independientemente 0 o 1, p es un número entero de 1 a 5, q es un número entero de 1 a 5, y R es un número entero de 1 a 5.

15 14. Método según la reivindicación 12, en el que el miembro del sistema de producción de señales se selecciona del grupo que consiste en sensibilizadores y compuestos quimioluminiscentes, y en el que opcionalmente el miembro del sistema de producción de señales se asocia con una partícula, o es un fotosensibilizador y la combinación comprende además un reactivo quimioluminiscente, o es un compuesto quimioluminiscente y la combinación comprende además un reactivo fotosensibilizador.

20

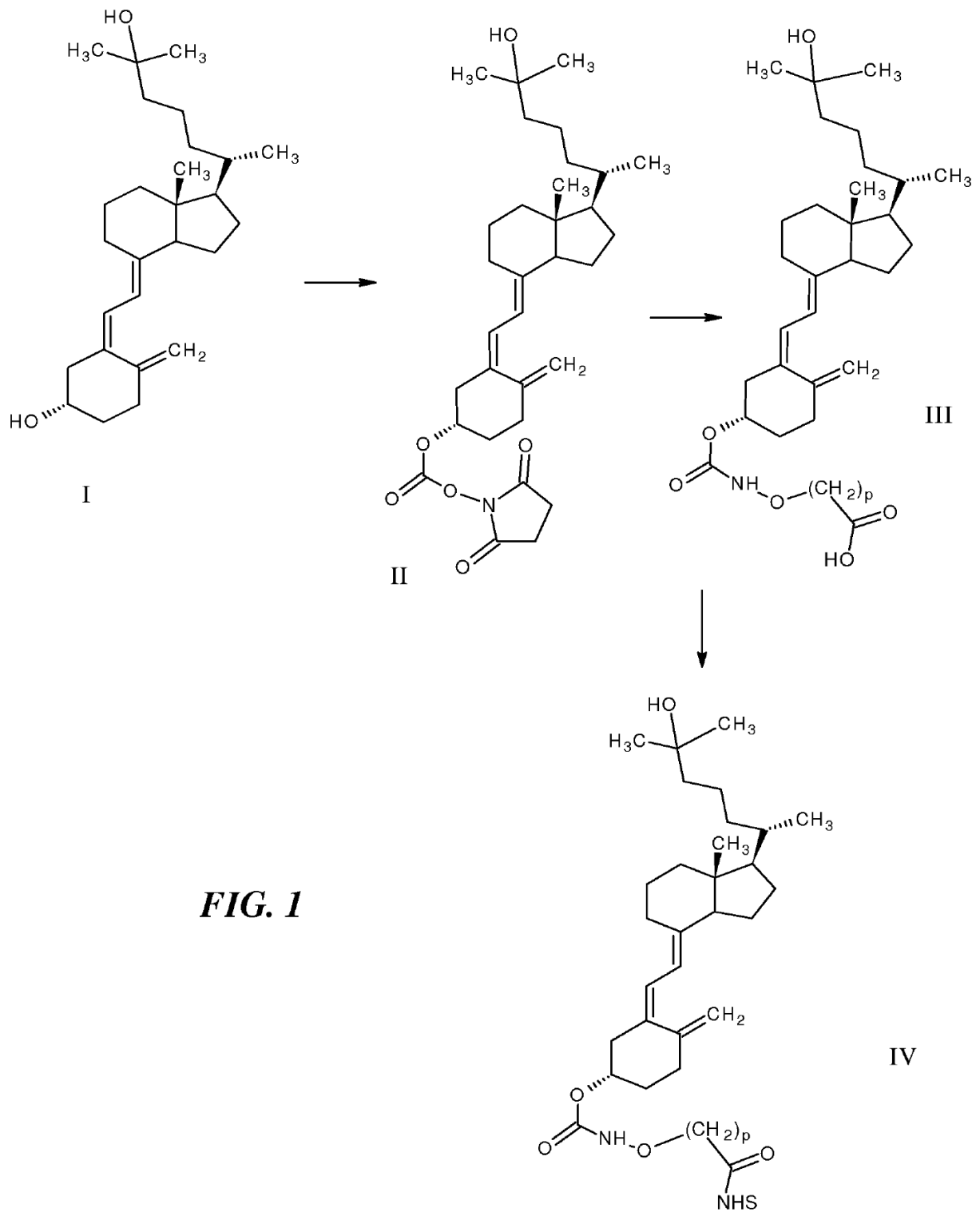


FIG. 1

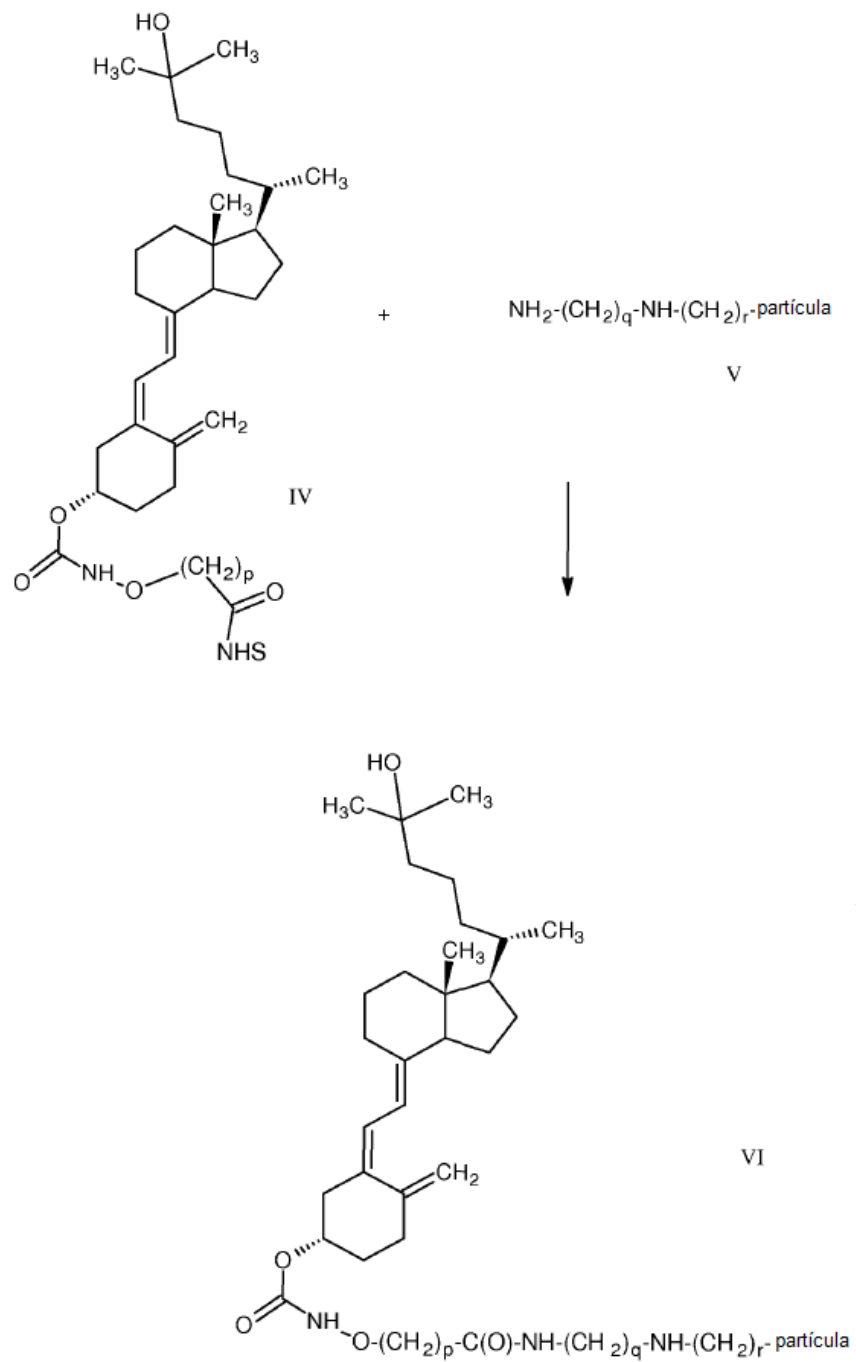


FIG. 2