

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 849**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2011 E 17202244 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 3327442**

54 Título: **Reactivo de liberación para compuestos de vitamina D**

30 Prioridad:

**20.05.2010 EP 10163453**  
**15.03.2011 EP 11158296**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.11.2020**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**ANTONI, SASCHA y**  
**VOGL, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 795 849 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

Reactivo de liberación para compuestos de vitamina D

5 **Información preliminar**

10 La presente invención se refiere a una composición de reactivo para liberar compuestos de vitamina D unidos a la proteína de unión a la vitamina D, un procedimiento *in vitro* para la detección de un compuesto de vitamina D en el que el compuesto de vitamina D se libera de la proteína de unión a la vitamina D por el uso de esta composición de reactivo y la mezcla de reactivo obtenida de esta manera. También se refiere al uso de la composición de reactivo divulgada para liberar compuestos de vitamina D, así como a un kit para detectar un compuesto de vitamina D que contiene la composición de reactivo para liberar compuestos de vitamina D además de reactivos de detección comunes.

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

20 Los seres humanos solo pueden producir las vitaminas D<sub>3</sub> o calciferoles por la acción de los rayos ultravioleta de la luz solar sobre la piel. En la sangre, la vitamina D<sub>3</sub> se une a la llamada proteína de unión a la vitamina D y se transporta al hígado, donde se convierte en 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> por 25-hidroxilación. Actualmente es conocido que una multitud de otros tejidos están implicados en el metabolismo de la vitamina D, además de la piel y el hígado, los dos órganos que ya se han mencionado (Schmidt-Gayk, H. *et al.* (eds.), "Calcium regulating hormones, vitamin D metabolites and cyclic AMP", Springer Verlag, Heidelberg (1990) pp. 24-47). La 25-hidroxivitamina D, y, de forma más específica, la 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> y la 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>, son la forma de almacenamiento central de la vitamina D en el organismo humano con respecto a sus cantidades. Cuando sea necesario, estos precursores se pueden convertir en los riñones para formar la 1 $\alpha$ ,25-dihidroxivitamina D biológicamente activa, la llamada hormona D. La vitamina D biológicamente activa regula, entre otras, la absorción de calcio del intestino, la mineralización ósea e influye en un gran número de otras vías metabólicas, tales como, por ejemplo, el sistema insulínico.

35 La medición del nivel de vitamina D por sí misma es de poco beneficio cuando se determina la situación de vitamina D de un paciente, ya que las concentraciones de vitamina D (vitamina D<sub>2</sub> y vitamina D<sub>3</sub>) fluctúan en gran medida dependiendo de la absorción de alimentos o de la exposición a la luz solar. Además, la vitamina D tiene una semivida biológica relativamente corta en la circulación (24 horas) y, por lo tanto, también por este motivo no es un parámetro adecuado para determinar la situación de vitamina D de un paciente. Lo mismo también se aplica a las formas fisiológicamente activas de la vitamina D (1,25-dihidroxivitamina D). Estas formas biológicamente activas también se producen en concentraciones relativamente pequeñas y altamente fluctuantes en comparación con la 25-hidroxivitamina D. Por todos estos motivos, la cuantificación de 25-hidroxivitamina D es, en particular, un medio adecuado para analizar de forma global la situación de vitamina D total de un paciente.

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

50 La unión de 25-hidroxivitamina D u otros compuestos de vitamina D a la proteína de unión a la vitamina D complica enormemente la determinación de los compuestos de vitamina D. Todos los procedimientos conocidos requieren que el compuesto de vitamina D que se va a analizar se libere o se desprenda del complejo que forma con la proteína de unión a la vitamina D. En lo que sigue, en aras de simplicidad, esto se denomina liberación de un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D, aunque, por supuesto, solo se puede liberar de un complejo de compuesto de vitamina D y proteína de unión a la vitamina D y no exclusivamente de la proteína de unión a la vitamina D.

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

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

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

Otros enfoques para la determinación de 25-hidroxivitamina D se basan, entre otros, en el uso de proteínas de unión a la vitamina D como las que están presentes en la leche. Por tanto, Holick, M.F. y Ray, R. (documento US 5.981.779) y DeLuca *et al.* (documento EP 0 583 945) describen ensayos con vitamina D para hidroxivitamina D y dihidroxivitamina D que se basan en la unión de estas sustancias a la proteína de unión a la vitamina D donde las concentraciones de estas sustancias se determinan por medio de un procedimiento de prueba competitiva. Sin embargo, un requisito previo de este procedimiento es que los metabolitos de la vitamina D que se van a determinar en primer lugar se tienen que aislar de las muestras de sangre o suero originales y se tienen que purificar, por ejemplo, por cromatografía.

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

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

En los últimos años, se propusieron una serie de reactivos de liberación diferentes que, en principio, deben ser adecuados para liberar compuestos de vitamina D de cualquier proteína de unión presente en la muestra. Sin embargo, esta liberación o desprendimiento se debe llevar a cabo en condiciones relativamente suaves, posibilitando, por tanto, un uso directo de la muestra tratada con el reactivo de liberación en una prueba de unión (véanse, por ejemplo, los documentos WO 02/57797 y US 2004/0132104). A pesar de los inmensos esfuerzos en los últimos años, todos los procedimientos disponibles para determinar la vitamina D tienen desventajas, tales como una preparación laboriosa de las muestras, escasa estandarización, escasa concordancia entre los procedimientos de prueba o mala recuperación de la vitamina D enriquecida (para esto véase, en particular, Zerwekh, J.E., *supra*). En el documento WO 2008/092917 se muestra la determinación directa de la vitamina D en suero o plasma con un anticuerpo después de digestión proteolítica de la proteína de unión a la vitamina D por una serina proteínasa a pH 3-10 en presencia de agentes de desnaturalización. En el documento WO 2007/140962 se libera un metabolito de la vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D usando un reactivo de liberación; a continuación, se separa con cromatografía y se mide durante o después de dicha separación cromatográfica. En Applications, Elsevier, Ámsterdam, NL, vol. 878, n.º 15-16, 1 de mayo de 2010 (01-05-2010), páginas 1163-1168, se muestra la medición de 25-OH-vitamina D en suero humano usando cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en tándem.

En el documento US 7.087.395, se han usado hidróxidos de metal, así como ciclodextrina y derivados de la misma, y salicatos de metal para liberar compuestos de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D, lo que da como resultado una desnaturalización irreversible de la proteína de unión a la vitamina D u otras proteínas en suero. Se han usado tensioactivos como Triton X100 o Tween-20 para evitar que el compuesto de vitamina D se una de forma no específica a lípidos y proteínas en la muestra después de la desnaturalización.

Es en particular difícil automatizar una prueba para determinar un compuesto de vitamina D. La automatización requiere resolver un problema muy difícil, es decir, sobrevivir un camino en la cuerda floja: por una parte, es necesario liberar compuestos de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D con la ayuda de un reactivo de liberación adecuado, por otra parte, se tienen que seleccionar condiciones de modo que la muestra se pueda analizar directamente de forma adicional. Un requisito previo de este análisis directo adicional es que, por una parte, la proteína de unión a la vitamina D endógena no se una o ya no se una en un grado significativo a los compuestos de vitamina D durante este análisis y, por tanto, no interfiera en este análisis y, por otra parte, que el reactivo de liberación usado no interfiera en la unión de los reactivos de detección, tales como anticuerpos, o la proteína de unión a la vitamina D. Además, es conocido que están presentes alelos diferentes de la proteína de unión a la vitamina D en la población humana que se comportan de forma bioquímicamente diferente. La liberación y medición de los compuestos de vitamina D debe ser comparable para diversos alelos/fenotipos.

Por tanto, el objetivo de la presente invención fue desarrollar una composición de reactivo para la liberación de compuestos de vitamina D y, en particular, para compuestos de hidroxivitamina D, de la proteína de unión a la vitamina D en una muestra, lo que puede superar al menos parcialmente los problemas de la técnica anterior. En lo que sigue, se describen una composición de reactivo adecuada para liberar compuestos de vitamina D, un procedimiento *in vitro* para determinar compuestos de vitamina D, el uso de la composición de reactivo y kits para la determinación de compuestos de vitamina D usando esta composición de reactivo, y se engloban por las reivindicaciones adjuntas.

### **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para liberar un compuesto de vitamina D de la proteína

de unión a la vitamina D que comprende la etapa de a) proporcionar una muestra que se va a investigar y b) mezclar la muestra de la etapa (a) con i) un reactivo que contiene una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis en una concentración de 0,1 M a 2,0 M, ii) un agente reductor y iii) un agente alcalinizante, liberando, de este modo, el compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D.

En otro modo de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para medir un compuesto de vitamina D que comprende las etapas de a) proporcionar una muestra que se va a investigar, b) mezclar la muestra de la etapa (a) con i) un reactivo que contiene una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis en una concentración de 0,1 M a 2,0 M, ii) un agente reductor y iii) un agente alcalinizante, liberando, de este modo, un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D, y c) medir el compuesto de vitamina D liberado en la etapa (b).

También se describe una composición de reactivo para la liberación de un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D, que comprende una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis en una concentración de 0,1 M a 2,0 M y un agente reductor.

Se describe además una mezcla de reactivo que comprende una muestra que se va a investigar, una composición de reactivo para la liberación de un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D, una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis en una concentración de 0,1 M a 2,0 M y un agente reductor, y un agente alcalinizante.

También se describe un kit para la liberación de un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D, que contiene una composición de reactivo que comprende una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis en una concentración de 0,1 M a 2,0 M y un agente reductor.

#### **Descripción detallada**

La presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para liberar un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D que comprende la etapa de a) proporcionar una muestra que se va a investigar, b) mezclar la muestra de la etapa (a) con i) un reactivo que contiene una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis en una concentración de 0,1 M a 2,0 M, ii) un agente reductor y iii) un agente alcalinizante, liberando, de este modo, el compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D.

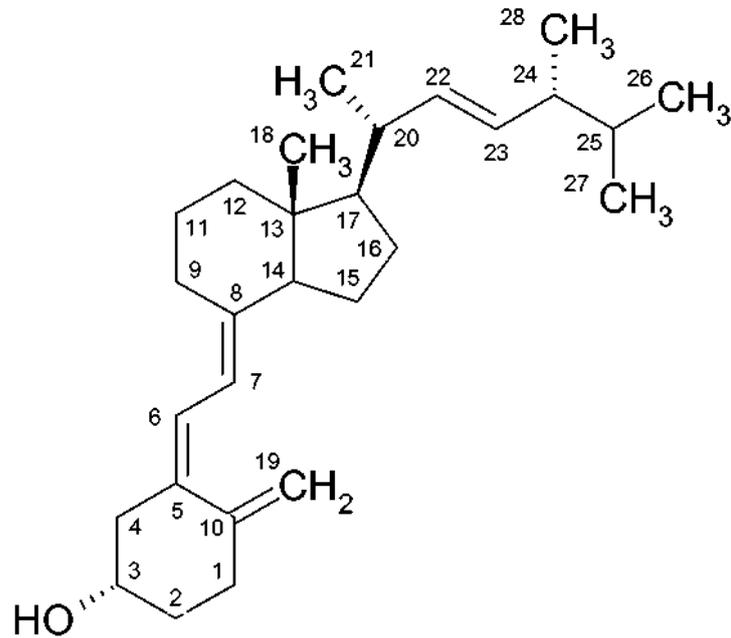
Como se usa en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado con el mismo en esta sección.

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

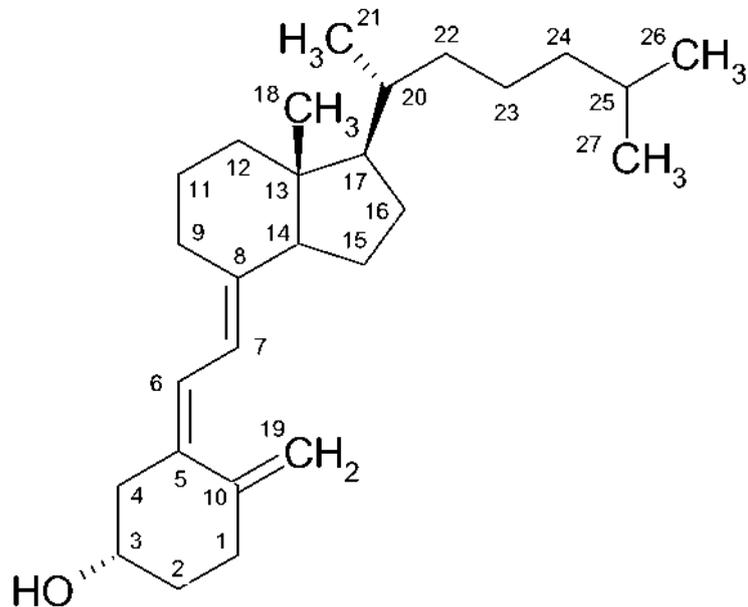
La expresión "uno o más" indica de 1 a 50, preferentemente de 1 a 20, también preferente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 o 15.

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

## Fórmula I



## 5 Fórmula II



10 En las fórmulas estructurales I y II, las posiciones de la vitamina D se establecen de acuerdo con la nomenclatura de los esteroides. La 25-hidroxitamina D indica metabolitos de la vitamina D que están hidroxilados en la posición 25 de las fórmulas estructurales I y II, es decir, la 25-hidroxitamina D<sub>2</sub>, así como la 25-hidroxitamina D<sub>3</sub>. Los compuestos de hidroxivitamina D conocidos adicionales son, por ejemplo, las formas 1,25-dihidroxitamina D y 24,25-dihidroxitamina D.

15 1,25-dihidroxitamina D se refiere a las formas activas de la vitamina D (las llamadas hormonas D) que tienen una hidroxilación en la posición 1, así como en la posición 25, de las fórmulas estructurales I y II.

Otros compuestos de vitamina D bien conocidos son 24,25-dihidroxitamina D<sub>2</sub>, 24,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> y epi en

C3 de 25-hidroxivitamina D.

De forma sorprendente, se ha descubierto por los autores de la invención, que la presencia de una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis en condiciones alcalinas en el procedimiento *in vitro* divulgado en la presente invención da lugar a la liberación de compuestos de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D.

Un "ion hidrogenocarbonato" (ion bicarbonato) de acuerdo con la presente invención es un anión con la fórmula empírica  $\text{HCO}_3^-$  y una masa molecular de 61,01 dalton.

Una "sal de hidrogenocarbonato" de acuerdo con la presente invención es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en hidrogenocarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), hidrogenocarbonato de potasio ( $\text{KHCO}_3$ ), hidrogenocarbonato de amonio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), hidrogenocarbonato de calcio ( $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ ) e hidrogenocarbonato de magnesio ( $\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$ ).

Una "sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis" de acuerdo con la presente invención es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ésteres de carbonato o pirocarbonatos.

Un "éster de carbonato" de acuerdo con la presente invención es un grupo carbonilo flanqueado por dos grupos alcoxi. La estructura general de estos carbonatos es  $\text{R}_1\text{O}(\text{C}=\text{O})\text{OR}_2$ . Existen ésteres de carbonato cíclicos (por ejemplo, carbonato de etileno) o ésteres de carbonato no cíclicos (por ejemplo, carbonato de dimetilo), así como derivados hidroxilados o halogenados de los mismos disponibles.

Preferentemente, dicha sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis de acuerdo con la etapa i) del procedimiento tiene una concentración de 0,1 M a 1,5 M, o de 0,2 M a 1,0 M, o de al menos 0,1, 0,2, 0,3 o 0,4 M, o de como máximo 2,0, 1,7, 1,5, 1,3, 1,0 o 0,75 M, respectivamente.

En un modo de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para liberar un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D que comprende la etapa de a) proporcionar una muestra que se va a investigar, b) mezclar la muestra de la etapa (a) con i) un reactivo que contiene una sal de hidrogenocarbonato en una concentración de 0,1 a 2,0 M, ii) un agente reductor y iii) un agente alcalinizante, liberando, de este modo, el compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D.

Preferentemente, dicha sal de hidrogenocarbonato de acuerdo con la etapa i) del procedimiento tiene una concentración de 0,1 M a 1,5 M, o de 0,2 M a 1,0 M, o de al menos 0,1, 0,2, 0,3 o 0,4 M, o de como máximo 2,0, 1,7, 1,5, 1,3, 1,0 o 0,75 M, respectivamente.

En un modo de realización preferente, la sal de hidrogenocarbonato se selecciona del grupo que consiste en hidrogenocarbonato de sodio, hidrogenocarbonato de potasio, hidrogenocarbonato de amonio, hidrogenocarbonato de calcio e hidrogenocarbonato de magnesio. En otro modo de realización preferente, la sal de hidrogenocarbonato se selecciona del grupo que consiste en hidrogenocarbonato de sodio, hidrogenocarbonato de potasio e hidrogenocarbonato de amonio. Más preferente, la sal de hidrogenocarbonato se selecciona del grupo que consiste en hidrogenocarbonato de sodio e hidrogenocarbonato de potasio.

En un modo de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para liberar un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D que comprende la etapa de a) proporcionar una muestra que se va a investigar, b) mezclar la muestra de la etapa (a) con i) un reactivo que contiene una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis en una concentración de 0,1 a 2,0 M, ii) un agente reductor, y iii) un agente alcalinizante, liberando, de este modo, el compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D.

Preferentemente, dicha sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis de acuerdo con la etapa i) del procedimiento tiene una concentración de 0,1 M a 1,5 M, o de 0,2 M a 1,0 M, o de al menos 0,1, 0,2, 0,3 o 0,4 M, o de como máximo 2,0, 1,7, 1,5, 1,3, 1,0 o 0,75 M, respectivamente.

En un modo de realización preferente, la sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis es un éster de carbonato cíclico o no cíclico o un derivado hidroxilado o halogenado del mismo, respectivamente. En otro modo de realización preferente, la sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis es un éster de carbonato cíclico o no cíclico o un derivado halogenado del mismo, respectivamente. En otro modo de realización preferente, el éster de carbonato cíclico o no cíclico o el derivado halogenado del mismo se selecciona del grupo que consiste en carbonato de etileno, carbonato de dimetilo, carbonato de propileno, carbonato de vinileno, carbonato de trimetileno, bis(carbonato) de eritritol, 1,2-carbonato de glicerol, 4-cloro-1,3-dioxolan-2-ona, 4,5-dicloro-1,3-dioxolan-2-ona, éster dimetilico del ácido 2,5-dioxahexanodioico, pirocarbonato, carbonato de 1,2-butileno, carbonato de cis-2,3-butileno y carbonato de trans-2,3-butileno. Más preferente, el éster de carbonato cíclico o no cíclico o el derivado halogenado del mismo se selecciona del grupo que

consiste en carbonato de etileno, carbonato de dimetilo, carbonato de propileno, carbonato de vinileno, carbonato de trimetileno, bis(carbonato) de eritritol, 1,2-carbonato de glicerol, 4-cloro-1,3-dioxolan-2-ona y 4,5-dicloro-1,3-dioxolan-2-ona.

5 Más preferente, el éster de carbonato cíclico o no cíclico se selecciona del grupo que consiste en carbonato de etileno, carbonato de dimetilo, 1,2-carbonato de glicerol, carbonato de propileno y carbonato de vinileno. Más preferente, el éster de carbonato cíclico o no cíclico se selecciona del grupo que consiste en carbonato de etileno, carbonato de dimetilo, 1,2-carbonato de glicerol y carbonato de propileno. Más preferente, el éster de carbonato cíclico o no cíclico se selecciona del grupo que consiste en carbonato de etileno, carbonato de dimetilo y  
10 1,2-carbonato de glicerol.

En un modo de realización, dicho éster de carbonato cíclico o no cíclico de acuerdo con la etapa i) del procedimiento tiene una concentración de 0,1 M a 2,0 M. Preferentemente, dicho éster de carbonato cíclico o no cíclico tiene una concentración de 0,1 M a 1,5 M, o de 0,2 M a 1,0 M, o de al menos 0,1, 0,2, 0,3 o 0,4 M, o de como máximo 2,0, 1,7,  
15 1,5, 1,3, 1,0 o 0,75 M, respectivamente.

En un modo de realización, el reactivo que contiene una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis de la etapa (i) de acuerdo con el procedimiento de la presente invención es soluble a al menos 2 M en una solución acuosa en las condiciones apropiadas para liberar un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D. En otro modo de realización, el reactivo que contiene una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis de la etapa (i) de acuerdo con el procedimiento de la presente invención es soluble a al menos 1,5 M, o,  
20 más preferente, es soluble a al menos 1,0 M, en una solución acuosa en las condiciones apropiadas para liberar un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D. Es conocido para el experto en la técnica cómo solubilizar una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis en agua para lograr el reactivo de la etapa (i) del procedimiento de acuerdo con la presente invención. La sal de hidrogenocarbonato o la sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis debe ser soluble en agua a 25 °C. La sal de hidrogenocarbonato o la sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis solubilizada en una solución acuosa se debe poder almacenar a una temperatura de 4 °C sin separación o cristalización.  
25 30

La proporción molar de la sal de hidrogenocarbonato o la sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis, respectivamente, con respecto al agente alcalinizante está preferentemente entre 1 : 3 y 3 : 1, más preferentemente entre 1 : 2 y 2 : 1 y más preferentemente entre 1 : 1,5 y 1,5 : 1.  
35

El experto en la técnica también es consciente de que la proporción molar del agente alcalinizante con respecto a las sales de hidrogenocarbonato y/o sustancias que puedan liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis se calcula sobre las concentraciones correspondientes de los iones reactivos  $\text{OH}^-$  o  $\text{HCO}_3^-$ .

40 Es conocido para el experto en la técnica que se pueda usar una mezcla de al menos dos sales de hidrogenocarbonato diferentes y/o sustancias que puedan liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) diferentes tras la hidrólisis, respectivamente, en un procedimiento de acuerdo con la presente invención. La proporción molar de dichas mezclas de sales de hidrogenocarbonato y/o la sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis con respecto al agente alcalinizante está preferentemente entre 1 : 3 y 3 : 1, más preferentemente entre 1 : 2 y 2 : 1 y más preferentemente entre 1 : 1,5 y 1,5 : 1.  
45

Sin querer vincularse a esta teoría, es posible que la presencia de una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis en la composición de reactivo induzca un cambio de pH. Concentraciones menores de dicha sal de hidrogenocarbonato o dicha sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis en una composición de reactivo provocan una reducción de pH más lenta de la mezcla de reactivo durante la reacción de pretratamiento. Concentraciones más altas de dicha sal de hidrogenocarbonato o dicha sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis en la composición de reactivo provocan una reducción de pH más rápida de la mezcla de reactivo durante la reacción de pretratamiento. También parece que, debido a la acción coordinada de una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis y el agente reductor en condiciones de tampón alcalino, se logra una desnaturalización irreversible de la proteína de unión a la vitamina D y, de este modo, se facilita la detección posterior de un compuesto de vitamina D.  
50 55

En un modo de realización, el agente reductor de la etapa ii) de acuerdo con el procedimiento se selecciona del grupo que consiste en 2-mercaptoetanol, 2-mercaptoetilamina-HCl, TCEP, cisteína-HCl, ditiotreitól (DTT), N-metilmaleimida, reactivo de Ellman y ácido 1,2-ditiolano-3-carboxílico.  
60

En otro modo de realización, el agente reductor de la etapa ii) de acuerdo con el procedimiento se caracteriza por que el agente reductor de la etapa ii) contiene grupos tiol.  
65

En otro modo de realización, el agente reductor de la etapa ii) de acuerdo con el procedimiento se selecciona del

grupo que consiste en 2-mercaptoetanol, 2-mercaptoetilamina-HCl, TCEP, cisteína-HCl y ditioneitol (DTT).

En un modo de realización, el agente reductor de la etapa ii) de acuerdo con el procedimiento tiene una concentración de 2 mM a 30 mM, en otro modo de realización de 3 mM a 20 mM, en otro modo de realización de 3,5 mM a 15 mM, y en otro modo de realización de 4 mM a 10 mM.

Un "agente alcalinizante" puede ser un hidróxido alcalino o hidróxido de metal alcalinotérreo (es decir, en una solución acuosa). Un agente alcalinizante también puede comprender una mezcla de hidróxidos alcalinos y/o hidróxidos de metal alcalinotérreo, es decir, NaOH y KOH, NaOH y LiOH, NaOH y Ca(OH)<sub>2</sub>, KOH y Ca(OH)<sub>2</sub>, KOH y LiOH, así como otras combinaciones.

Los "hidróxidos alcalinos" son una clase de compuestos químicos que están compuestos de un catión de metal alcalino y el anión hidróxido (OH<sup>-</sup>). Los hidróxidos alcalinos son tales como NaOH, KOH, LiOH, RbOH y CsOH. Los "metales alcalinos" son una serie de elementos químicos que forman el grupo 1 (estilo IUPAC) de la tabla periódica: litio (Li), sodio (Na), potasio (K), rubidio (Rb), cesio (Cs) y francio (Fr).

Los "hidróxidos de metal alcalinotérreo" son una clase de compuestos químicos que están compuestos de un catión de metal alcalinotérreo y 2 aniones hidróxido (OH<sup>-</sup>). "Metales alcalinotérreos" que comprenden el grupo 2 (estilo IUPAC) (grupo IIA) de la tabla periódica: berilio (Be), magnesio (Mg), calcio (Ca), estroncio (Sr), bario (Ba) y radio (Ra).

En un modo de realización, el agente alcalinizante de la etapa iii) de acuerdo con el procedimiento de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en NaOH, KOH, Ca(OH)<sub>2</sub> y LiOH.

En otro modo de realización, el agente alcalinizante de la etapa iii) de acuerdo con el procedimiento tiene una concentración de 0,1 M a 2,0 M, o de 0,1 M a 1,5 M, o de 0,2 M a 1,75 M o de 0,2 M a 1,0 M, o de al menos 0,1, 0,2, 0,3 o 0,4 M, o de como máximo 2,0, 1,7, 1,5, 1,3, 1,0 o 0,75 M, respectivamente.

En otro modo de realización, el agente alcalinizante de la etapa iii) de acuerdo con el procedimiento se selecciona del grupo que consiste en NaOH y KOH.

En otro modo de realización, el agente alcalinizante usado en el procedimiento de acuerdo con la presente invención tiene en la mezcla de muestra + reactivo i) + agente reductor ii) + agente alcalinizante iii) una concentración final de 0,1 M a 0,6 M, o de 0,2 M a 0,5 M, o de al menos 0,1 o 0,2 M, o de como máximo 0,6 o 0,5 M, respectivamente.

En otro modo de realización del procedimiento, la proporción de mezcla de los tres reactivos de las etapas i), ii) y iii), respectivamente, con respecto a una muestra que se va a investigar está preferentemente entre 1 : 3 y 3 : 1.

En un modo de realización, se podrían añadir la muestra de la etapa a), el reactivo de la etapa i) que contiene una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) tras la hidrólisis + el agente reductor de la etapa ii) + el agente alcalinizante de la etapa iii) de acuerdo con el procedimiento en cualquier secuencia de pipeteo. Tras mezclar, la etapa b) de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, en otro modo de realización, se puede caracterizar por que tiene al menos durante 10, 12, 15 o 20 segundos un valor de pH de 9,5 a 14, otra etapa preferente b) tiene, tras mezclar al menos durante 10, 12, 15 o 20 segundos, un valor de pH de 10,5 a 14.

En un modo de realización del procedimiento, la muestra que se va a investigar de la etapa a) se mezcla en la etapa b) con el reactivo de la etapa i) que contiene una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) tras la hidrólisis, el agente reductor de la etapa ii), el agente alcalinizante de la etapa iii), y se incuba. La etapa de incubación b) puede ser tan larga como se requiera. El tiempo de incubación es, por ejemplo, de 15 segundos a 24 h. En un modo de realización, la mezcla de la etapa b) de acuerdo con el procedimiento de la presente invención se incuba durante de 1 a 60 minutos, liberando, de este modo, el compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D.

Las concentraciones de los componentes de la etapa b) de acuerdo con el procedimiento se seleccionan fácilmente por un experto en la técnica, de modo que el intervalo de pH especificado y las concentraciones deseadas de una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) tras la hidrólisis, el agente reductor y el agente alcalinizante, respectivamente, durante la incubación con la muestra que se va a investigar sean apropiados para liberar el compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D.

Las condiciones alcalinas dan como resultado la desnaturalización de la proteína de unión a la vitamina D y la liberación de vitamina D presente en la muestra que se va a investigar. La concentración del agente alcalinizante tiene que ser suficiente para incrementar el pH de la "mezcla de reactivo" (= una muestra que se va a investigar + composición de reactivo de acuerdo con la presente invención + agente alcalinizante) a al menos pH 10,0, preferentemente a al menos pH 10,5, más preferentemente a al menos 11,0 en la reacción de pretratamiento. El experto en la técnica es consciente de que el pH de la mezcla de reactivo se tiene que medir en el momento de la

mezcla de la muestra que se va a investigar + composición de reactivo de acuerdo con la presente invención + agente alcalinizante. Debido a la hidrólisis de la sal de hidrogenocarbonato y/o la sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis, el pH se reducirá en la mezcla de reactivo (véanse la fig. 1 y el ejemplo 1.5).

5 El término "muestra" como se usa en el presente documento se refiere a una muestra biológica obtenida de un individuo para el propósito de su evaluación *in vitro*. En los procedimientos de la presente invención, la muestra que se va a investigar, en un modo de realización, es una muestra líquida. La muestra puede comprender en otro modo de realización de la presente invención cualquier líquido corporal. En otro modo de realización, la muestra que se va a investigar es sangre, suero o plasma, siendo lo más preferente suero o plasma. En otro modo de realización, la muestra líquida se seca en un papel de filtro o membrana. En un modo de realización, la muestra usada en el presente documento se refiere a una alícuota de una muestra obtenida de un individuo.

15 La presente invención en otro modo de realización comprende un procedimiento *in vitro* para medir un compuesto de vitamina D que comprende las etapas de (a) liberar un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D y (b) medir el compuesto de vitamina D liberado en la etapa (a).

20 En otro modo de realización, la presente invención comprende un procedimiento *in vitro* para medir el compuesto de vitamina D que comprende las etapas de (a) liberar un compuesto de vitamina D unido a la proteína de unión a la vitamina D en una muestra de interés y (b) medir los compuestos de vitamina D liberados en la etapa (a).

25 En otro modo de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para medir un compuesto de vitamina D que comprende las etapas de a) proporcionar una muestra que se va a investigar, b) mezclar la muestra de la etapa (a) con i) un reactivo que contiene una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis en una concentración de 0,1 a 2,0 M, ii) un agente reductor y iii) un agente alcalinizante, liberando, de este modo, un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D, y c) medir el compuesto de vitamina D liberado en la etapa (b).

30 En otro modo de realización, la presente invención comprende un procedimiento *in vitro* para medir un compuesto de vitamina D, en el que el compuesto de vitamina D medido se selecciona del grupo que comprende 25-hidroxitamina D<sub>2</sub>, 25-hidroxitamina D<sub>3</sub>, 24,25-dihidroxitamina D<sub>2</sub>, 24,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> y epi en C3 de 25-hidroxitamina D.

35 En otro modo de realización, la presente invención comprende un procedimiento *in vitro* para medir un compuesto de vitamina D, en el que el compuesto de vitamina D medido se selecciona del grupo que comprende 25-hidroxitamina D<sub>2</sub>, 25-hidroxitamina D<sub>3</sub>, 24,25-dihidroxitamina D<sub>2</sub> y 24,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>.

40 En otro modo de realización, la presente invención comprende un procedimiento *in vitro* para medir un compuesto de vitamina D, en el que se determinan los compuestos de vitamina D 25-hidroxitamina D<sub>2</sub> y/o 25-hidroxitamina D<sub>3</sub>.

Composiciones de **reactivo** (para ilustración, no reivindicadas):

45 En un modo de realización, la presente invención se refiere a una composición de reactivo para la liberación de un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D en una muestra que se va a investigar, que contiene una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis en una concentración de 0,1 a 2,0 M y un agente reductor.

50 En otro modo de realización, la presente invención se refiere a una composición de reactivo para la liberación de un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D en una muestra que se va a investigar, que contiene una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis en una concentración de 0,1 a 1,5 M y un agente reductor.

55 En otro modo de realización, la presente invención se refiere a una composición de reactivo para la liberación de un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D en una muestra que se va a investigar, que contiene una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis en una concentración de 0,2 a 1,0 M y un agente reductor.

60 En otro modo de realización, la presente invención se refiere a una composición de reactivo para la liberación de un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D en una muestra que se va a investigar, que contiene una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis en una concentración de al menos 0,1, 0,2, 0,3 o 0,4 M y un agente reductor.

65 En otro modo de realización, la presente invención se refiere a una composición de reactivo para la liberación de un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D en una muestra que se va a investigar, que contiene una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis en una concentración de como máximo 2,0, 1,7, 1,5, 1,3, 1,0 o 0,75 M y un agente reductor.

En otro modo de realización, la presente invención se refiere a una composición de reactivo para la liberación de un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D en una muestra que se va a investigar, que contiene una sal de hidrogenocarbonato en una concentración de 0,1 M a 2,0 M y un agente reductor. Preferentemente, dicha composición de reactivo contiene una sal de hidrogenocarbonato en una concentración de 0,1 M a 1,5 M, o de 0,2 M a 1,0 M, o de al menos 0,1, 0,2, 0,3 o 0,4 M, o de como máximo 2,0, 1,7, 1,5, 1,3, 1,0 o 0,75 M, respectivamente, y un agente reductor. En otro modo de realización preferente, la sal de hidrogenocarbonato en la composición de reactivo se selecciona del grupo que consiste en hidrogenocarbonato de sodio, hidrogenocarbonato de potasio, hidrogenocarbonato de amonio, hidrogenocarbonato de calcio e hidrogenocarbonato de magnesio. Más preferente, la sal de hidrogenocarbonato en la composición de reactivo se selecciona del grupo que consiste en hidrogenocarbonato de sodio, hidrogenocarbonato de potasio e hidrogenocarbonato de amonio. Más preferente, la sal de hidrogenocarbonato en la composición de reactivo es hidrogenocarbonato de sodio y/o hidrogenocarbonato de potasio.

En otro modo de realización, la presente invención se refiere a una composición de reactivo para la liberación de un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D en una muestra que se va a investigar, que contiene una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis en una concentración de 0,1 M a 2,0 M y un agente reductor. Preferentemente, dicha composición de reactivo contiene una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis en una concentración de 0,1 M a 1,5 M, o de 0,2 M a 1,0 M, o de al menos 0,1, 0,2, 0,3 o 0,4 M, o de como máximo 2,0, 1,7, 1,5, 1,3, 1,0 o 0,75 M, respectivamente, y un agente reductor.

En otro modo de realización, la presente invención se refiere a una composición de reactivo para la liberación de un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D en una muestra que se va a investigar, que contiene un éster de carbonato cíclico o no cíclico o un derivado hidroxilado o halogenado del mismo, respectivamente, en una concentración de 0,1 M a 2,0 M y un agente reductor. Preferentemente, dicha composición de reactivo contiene un éster de carbonato cíclico o no cíclico o un derivado halogenado del mismo, respectivamente, en una concentración de 0,1 M a 1,5 M, o de 0,2 M a 1,0 M, o de al menos 0,1, 0,2, 0,3 o 0,4 M, o de como máximo 2,0, 1,7, 1,5, 1,3, 1,0 o 0,75 M, respectivamente, y un agente reductor.

En otro modo de realización, la presente invención se refiere a una composición de reactivo para la liberación de un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D en una muestra que se va a investigar, que contiene un éster de carbonato cíclico o no cíclico o derivado halogenado del mismo, respectivamente, en una concentración de 0,1 M a 2,0 M y un agente reductor. Preferentemente, dicha composición de reactivo contiene un éster de carbonato cíclico o no cíclico o derivado halogenado del mismo, respectivamente, en una concentración de 0,1 M a 1,5 M, o de 0,2 M a 1,0 M, o de al menos 0,1, 0,2, 0,3 o 0,4 M, o de como máximo 2,0, 1,7, 1,5, 1,3, 1,0 o 0,75 M, respectivamente, y un agente reductor. En otro modo de realización preferente, el éster de carbonato cíclico o no cíclico o el derivado halogenado del mismo en la composición de reactivo se selecciona del grupo que consiste en carbonato de etileno, carbonato de dimetilo, carbonato de propileno, carbonato de vinileno, carbonato de trimetileno, bis(carbonato) de eritritol, 1,2-carbonato de glicerol, 4-cloro-1,3-dioxolan-2-ona, 4,5-dicloro-1,3-dioxolan-2-ona, éster dimetilico del ácido 2,5-dioxahexanodioico, pirocarbonato, carbonato de 1,2-butileno, carbonato de cis-2,3-butileno y carbonato de trans-2,3-butileno. Más preferente, el éster de carbonato cíclico o no cíclico o el derivado halogenado del mismo en la composición de reactivo se selecciona del grupo que consiste en carbonato de etileno, carbonato de dimetilo, carbonato de propileno, carbonato de vinileno, carbonato de trimetileno, bis(carbonato) de eritritol, 1,2-carbonato de glicerol, 4-cloro-1,3-dioxolan-2-ona y 4,5-dicloro-1,3-dioxolan-2-ona. Más preferente, el éster de carbonato cíclico o no cíclico en la composición de reactivo se selecciona del grupo que consiste en carbonato de etileno, carbonato de dimetilo, 1,2-carbonato de glicerol, carbonato de propileno, carbonato de vinileno. Más preferente, el éster de carbonato cíclico o no cíclico en la composición de reactivo se selecciona del grupo que consiste en carbonato de etileno, carbonato de dimetilo, 1,2-carbonato de glicerol y carbonato de propileno. Más preferente, el éster de carbonato cíclico o no cíclico en la composición de reactivo se selecciona del grupo que consiste en carbonato de etileno, carbonato de dimetilo y 1,2-carbonato de glicerol.

La presente invención se refiere en otro modo de realización a una composición de reactivo caracterizada por que el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en 2-mercaptoetanol, 2-mercaptoetilamina-HCl, TCEP, cisteína-HCl, ditiotreitolo (DTT), N-metilmaleimida, reactivo de Ellman y ácido 1,2-ditolano-3-carboxílico.

En otro modo de realización, la presente invención se refiere a una composición de reactivo caracterizada por que el agente reductor contiene grupos tiol.

En otro modo de realización, la presente invención se refiere a una composición de reactivo caracterizada por que el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en 2-mercaptoetanol, 2-mercaptoetilamina-HCl, TCEP, cisteína-HCl y ditiotreitolo (DTT).

La concentración de un agente reductor en un determinado modo de realización de la presente invención es de 2 mM a 30 mM, en otro modo de realización de 3 mM a 20 mM, en otro modo de realización de 3,5 mM a 15 mM y en otro modo de realización de 4 mM a 10 mM.

Es conocido para el experto en la técnica que la capacidad de un agente reductor es dependiente de la presencia de grupos funcionales, es decir, reductores. Por lo tanto, es conocido para el experto en la técnica seleccionar la concentración apropiada de un agente reductor teniendo en cuenta su número de grupos reductores activos.

5 El gen que codifica la proteína de unión a la vitamina D se produce en la población humana en forma de alelos diferentes. Es conocido que los polipéptidos codificados por estos alelos difieren bioquímicamente, es decir, dan lugar a fenotipos diferentes. Estas diferencias bioquímicas también influyen en la unión y liberación de compuestos de vitamina D. La composición de reactivo de acuerdo con la invención es adecuada para liberar compuestos de vitamina D independientemente del fenotipo de la proteína de unión a la vitamina D. Por tanto, un modo de realización preferente de la presente invención es el uso de una composición de reactivo de acuerdo con la invención para liberar compuestos de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D.

15 La composición de reactivo de acuerdo con la invención se usa, en un modo de realización, para liberar compuestos de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D en muestras que se van a investigar indistinta e independientemente de los fenotipos de la proteína de unión a la vitamina D.

20 Para el propósito de liberar compuestos de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D, se mezcla la composición de reactivo de acuerdo con la invención con una muestra que se va a investigar, por ejemplo, suero o plasma, y un agente alcalinizante.

Mezcla de **reactivo** (para ilustración, no reivindicada):

25 El término "mezcla de reactivo" como se usa a continuación en el presente documento comprende una muestra que se va a investigar, una composición de reactivo de acuerdo con la presente invención y un agente alcalinizante.

En otro modo de realización, la mezcla de reactivo se caracteriza por que el agente alcalinizante se selecciona del grupo que consiste en NaOH, KOH, Ca(OH)<sub>2</sub> y LiOH.

30 En otro modo de realización, la mezcla de reactivo se caracteriza por que el agente alcalinizante usado tiene una concentración de 0,1 M a 2,0 M, o de 0,1 M a 1,5 M, o de 0,2 M a 1,75 M, o de 0,2 M a 1,0 M, o de al menos 0,1, 0,2, 0,3 o 0,4 M, o de como máximo 2,0, 1,7, 1,5, 1,3, 1,0 o 0,75 M, respectivamente.

35 En otro modo de realización, la mezcla de reactivo de reactivo se caracteriza por que el agente alcalinizante se selecciona del grupo que consiste en NaOH y KOH.

40 En otro modo de realización, el agente alcalinizante usado en el procedimiento de acuerdo con la presente invención tiene en la mezcla de reactivo una concentración final de 0,1 M a 0,6 M, o de 0,2 M a 0,5 M, o de al menos 0,1 o 0,2 M, o de como máximo 0,6 o 0,5 M, respectivamente.

La proporción de mezcla de la composición de reactivo y el agente alcalinizante con respecto a una muestra que se va a investigar, en un modo de realización, está preferentemente entre 1 : 3 y 3 : 1.

45 Se podrían añadir una muestra que se fuera a investigar, la composición de reactivo divulgada y un agente alcalinizante en cualquier secuencia de pipeteo para formar la mezcla de reactivo. Tras mezclar, la mezcla de reactivo, en otro modo de realización, se caracteriza por que tiene al menos durante 10, 12, 15 o 20 segundos un valor de pH de 9,5 a 14, más preferente, la mezcla de reactivo tiene, tras mezclar al menos durante 10, 12, 15 o 20 segundos, un valor de pH de 10,5 a 14.

50 La muestra que se va a investigar se mezcla con la composición de reactivo de acuerdo con la invención y un agente alcalinizante y se incuba. Esta etapa también se puede llamar etapa de pretratamiento. La etapa de pretratamiento se puede realizar tan larga como se requiera. El tiempo de incubación es, por ejemplo, durante de 15 segundos a 24 h. La mezcla de reactivo, en un modo de realización, se incuba durante de 1 a 60 minutos para liberar compuestos de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D. La mezcla de reactivo, en otro modo de realización, se incuba durante de 4 a 10 minutos para liberar compuestos de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D.

60 La mezcla de reactivo y las concentraciones de los componentes en ella se seleccionan fácilmente por un experto en la técnica, de modo que el intervalo de pH especificado y las concentraciones deseadas de una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) tras la hidrólisis, el agente reductor y el agente alcalinizante, respectivamente, durante la incubación con una muestra que se va a investigar sean apropiados para liberar los compuestos de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D.

65 La mezcla de reactivo también comprende, en un modo de realización, las sustancias preferentes de una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) tras la hidrólisis como se describe para la composición de reactivo de la presente invención.

La detección de un compuesto de vitamina D se lleva a cabo preferentemente de modo que se detecte al menos un compuesto de vitamina D seleccionado del grupo que comprende 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub>, 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>, 24,25-dihidroxivitamina D<sub>2</sub>, 24,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> y epi en C3 de 25-hidroxivitamina D.

En la detección específica de un compuesto de vitamina D, otras etapas de incubación siguen después de la etapa de pretratamiento. El remanente del agente reductor presente en la mezcla de reactivo se puede bloquear por adición de proteínas inespecíficas, preferentemente, por ejemplo, seroalbúmina humana (SAH). Estas proteínas inespecíficas se pueden añadir por separado o se pueden incluir simplemente en la solución que también comprende el reactivo de detección. Bloqueando la capacidad reductora residual del agente reductor, es posible una detección no comprometida de un compuesto de vitamina D usando un agente de unión específica proteínico con respecto a un compuesto de vitamina D.

Como apreciará el experto en la técnica, la solución que comprende el agente de unión específica contendrá un sistema tampón de pH que garantice, después de la adición de la solución que contiene el agente de unión específica a la mezcla de reactivo, que el pH sea un requisito previo para la unión de un compuesto de vitamina D al agente de unión específica. Ni el sistema tampón necesariamente requerido ni el pH final son críticos siempre que tenga lugar la unión del agente de unión específica a un compuesto de vitamina D. En caso de que se use la proteína de unión a la vitamina D como un agente de unión específica, el pH durante esta etapa de incubación se selecciona preferentemente entre pH 6,0 y pH 9,0. En caso de que se use un anticuerpo como agente de unión específica para un compuesto de vitamina D, el pH durante esta etapa de incubación estará preferentemente entre pH 5,5 y pH 7,5.

La solución que comprende el agente de unión específica contiene preferentemente un sistema tampón que es de 20 mM a 400 mM. También preferente, el tampón tiene una molaridad de entre 50 mM y 350 mM o entre 100 mM y 300 mM.

El procedimiento *in vitro* para la detección de un compuesto de vitamina D, en base a la divulgación de la presente invención, se puede llevar a cabo de diversas formas.

En principio, se pueden usar todos los compañeros de unión proteínicos, tales como polipéptidos de unión de forma específica que se unan a uno o más compuestos de vitamina D, como agente de unión específica. Un agente de unión específica puede ser un anticuerpo o bien una proteína de unión a la vitamina D por sí misma.

Muchos sistemas de prueba comerciales se basan en el uso de fases sólidas recubiertas con avidina o estreptavidina (ES), por ejemplo, placas de microvaloración recubiertas con ES o látex recubiertos con ES.

Un derivado de analito biotinilado se une, por ejemplo, a esta fase sólida con ES antes o durante el procedimiento de prueba. Cuando se detecta un compuesto de vitamina D, este compuesto de derivado de analito biotinilado puede ser, por ejemplo, una 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> biotinilada y/o una 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> biotinilada.

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

En un modo de realización, el derivado de un compuesto de vitamina D es un compuesto de vitamina D biotinilada. En otro modo de realización, el compuesto de vitamina D biotinilada es una 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> biotinilada y/o 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> biotinilada. En otro modo de realización, el compuesto de vitamina D biotinilada es una 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> biotinilada.

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

#### Uso:

En un modo de realización, la presente invención se refiere al uso de una composición de reactivo conjuntamente con un agente alcalinizante para liberar un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D.

En otro modo de realización, la presente invención se refiere al uso de una composición de reactivo conjuntamente con un agente alcalinizante para liberar un compuesto de vitamina D que se espera que esté presente en una

muestra que se va a investigar de la proteína de unión a la vitamina D.

5 En otro modo de realización, la presente invención se refiere al uso de una composición de reactivo conjuntamente con un agente alcalinizante para liberar un compuesto de vitamina D en un procedimiento de detección de un compuesto de vitamina D.

10 En otro modo de realización, la presente invención se refiere al uso de una composición de reactivo que contiene de 0,1 M a 2,0 M de una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis, de 2 mM a 30 mM de un agente reductor, conjuntamente con una solución de 1 M a 1,5 M de un agente alcalinizante para liberar un compuesto de vitamina D que se espera que esté presente en una muestra que se va a investigar de la proteína de unión a la vitamina D en un procedimiento de detección de un compuesto de vitamina D.

15 El uso de la composición de reactivo también comprende, en un modo de realización, las sustancias preferentes de una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis como se describe para la composición de reactivo de la presente invención.

Kit (para ilustración, no reivindicado):

20 En un modo de realización, la presente invención se refiere un kit para la liberación de un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D, que contiene una composición de reactivo que comprende una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis en una concentración de 0,1 M a 2,0 M y un agente reductor.

25 En un modo de realización, la presente invención se refiere un kit para la detección de un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D, caracterizado por que comprende una composición de reactivo que tiene de 0,1 M a 2,0 M de una sal de hidrogenocarbonato o de una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis, un agente reductor y un agente alcalinizante.

30 En otro modo de realización, la presente invención se refiere a un kit para la detección de un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D, caracterizado por que comprende una composición de reactivo que tiene de 0,1 M a 2,0 M de una sal de hidrogenocarbonato o de una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis, de 2 mM a 30 mM de un agente reductor, y un agente alcalinizante.

35 En otro modo de realización, la presente invención se refiere a un kit para la detección de un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D, caracterizado por que comprende una composición de reactivo que tiene de 0,1 M a 2,0 M de una sal de hidrogenocarbonato o de una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis, de 2 mM a 30 mM de un agente reductor, una solución de 1 M a 1,5 M de un agente alcalinizante, además de los componentes de detección.

40 En otro modo de realización, la presente invención se refiere a un kit para la detección de un compuesto de vitamina D caracterizado por que comprende una composición de reactivo que tiene una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis, un agente reductor, una solución de un agente alcalinizante, además de una solución que comprende un agente de unión específica.

45 En otro modo de realización, la presente invención se refiere a un kit para la detección de un compuesto de vitamina D caracterizado por que comprende una composición de reactivo que tiene de 0,1 M a 2,0 M de una sal de hidrogenocarbonato o de una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis, de 2 mM a 30 mM de un agente reductor, una solución de 1 M a 1,5 M de un agente alcalinizante, y una solución que comprende un agente de unión específica.

50 En otro modo de realización, la presente invención se refiere a un kit para la detección de un compuesto de vitamina D caracterizado por que comprende una composición de reactivo que tiene de 0,1 M a 2,0 M de una sal de hidrogenocarbonato o de una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis, de 2 mM a 30 mM de un agente reductor seleccionado del grupo que consiste en 2-mercaptoetanol, 2-mercaptoetilamina-HCl, TCEP, cisteína-HCl y ditiotreitil (DTT), una solución de 1 M a 1,5 M de un agente alcalinizante seleccionado del grupo que consiste en NaOH, KOH,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y LiOH y una solución que comprende un agente de unión específica.

60 El kit también comprende, en un modo de realización, las sustancias preferentes de una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis como se describe para la composición de reactivo de la presente invención.

65 La composición de reactivo de acuerdo con la invención ha demostrado ser adecuada para su uso en una prueba automatizada para determinar compuestos de vitamina D. La presente invención se refiere preferentemente al uso de una composición de reactivo de acuerdo con la invención para liberar compuestos de vitamina D de la proteína

de unión a la vitamina D, especialmente en una prueba para la determinación de compuestos de vitamina D.

La prueba para determinar un compuesto de vitamina D preferentemente está completamente automatizada. Completamente automatizada en este caso significa que el experimentador solo tiene que colocar una muestra que se va a investigar y un envase con reactivo que contenga todos los componentes para medir un compuesto de vitamina D en un analizador automatizado y todas las demás etapas se llevan a cabo de forma automatizada por el analizador. La prueba completamente automatizada se lleva a cabo en particular preferentemente en un analizador Elecsys® de Roche Diagnostics.

La composición de reactivo de acuerdo con la invención se usa, en otro modo de realización, en un procedimiento *in vitro* para la detección de un compuesto de vitamina D seleccionado del grupo que comprende 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub>, 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>, 24,25-dihidroxivitamina D<sub>2</sub>, 24,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> y epi en C3 de 25-hidroxivitamina D.

Como ya se ha mencionado anteriormente, 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> y 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> son formas pertinentes en particular de la vitamina D para el diagnóstico. En el procedimiento *in vitro* de acuerdo con la invención, la detección específica de 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> o 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>, o ambas, por medio de un anticuerpo específico para 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> o 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> también representa un modo de realización preferente.

La invención se aclara además por los siguientes ejemplos y figuras. El alcance de protección real resulta de las reivindicaciones adjuntas a la presente invención.

#### **Descripción de las figuras:**

**Figura 1:** Cambio de pH de la mezcla de reactivo durante la etapa de pretratamiento. Se realizó el ensayo como se explica en el ejemplo 1.5. La composición de reactivo (A) contiene diversas concentraciones de carbonato de etileno (CE): CE 0,00 M (●), 0,10 M (◆), 0,30 M (□), 0,50 M (▲), 0,75 M (○), 1,00 M (■), 1,50 M (◇). El eje X muestra el tiempo en minutos, el eje Y, el pH.

**Figura 2:** Curvas de calibración de un ensayo con vitamina D como se describe en el ejemplo 1.5 con la composición de reactivo (A) que contiene diversas concentraciones de carbonato de etileno (CE): CE 1,50 M (●), 1,00 M (□), 0,75 M (◆), 0,50 M (○), 0,30 M (▲) y 0,10 M (◇). El eje X muestra la concentración en ng/ml, el eje Y muestra los recuentos determinados de forma habitual usando el sistema Elecsys® de la compañía Roche Diagnostics.

**Figura 3:** Curvas de calibración de un ensayo con vitamina D como se describe en el ejemplo 1.5 con la composición de reactivo (A) que contiene diversas concentraciones del agente reductor ditiotreitól (DTT): 1,0 mM (□), 2,0 mM (●), 4,0 mM (◆), 6,7 mM (○), 10,0 mM/12,0 mM (▲), 15,0 mM (◇). El eje X muestra la concentración en ng/ml, el eje Y muestra los recuentos determinados de forma habitual usando el sistema Elecsys® de la compañía Roche Diagnostics.

**Figura 4a: Comparación de procedimientos:** Ensayo con vitamina D (ejemplo 1) y cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en tándem (CL-EMT). Se determinó 25-hidroxivitamina D por medio de CL-EMT, así como por medio del ensayo con vitamina D del ejemplo 1.5, donde se usó la composición de reactivo (A) con carbonato de etileno (CE) 0,5 M para la incubación. Los resultados en ng/ml para múltiples muestras de suero se representan en el eje X para la CL-EMT y en el eje Y para el ensayo con vitamina D del ejemplo 1.5.

(---)  $y = x$

(—) Regresión lineal

Ensayo con vitamina D =  $2,0116 + 0,9036 * x$ , r de Pearson = 0,9509

**Figura 4b: Comparación de procedimientos:** Ensayo con vitamina D (ejemplo 1) y CL-EMT. Se determinó 25-hidroxivitamina D por medio de CL-EMT, así como por medio del ensayo con vitamina D del ejemplo 1.5, donde se usó la composición de reactivo (A) sin carbonato de etileno (CE) para la incubación. Los resultados en ng/ml para múltiples muestras de suero se representan en el eje X para la CL-EMT y en el eje Y para el ensayo con vitamina D del ejemplo 1.5.

(---)  $y = x$

(—) Regresión lineal

Ensayo con vitamina D =  $0,7496 + 0,7338 * x$ , r de Pearson = 0,7914

**Figura 5:** Curvas de calibración de un ensayo con vitamina D como se describe en el ejemplo 2 con la composición de reactivo (A) que contiene carbonato de etileno 0,5 M (◆), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M (○), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 M (▲),

NaCl 0,5 M ( $\diamond$ ) y control ( $\square$ ). El eje X muestra la concentración en ng/ml, el eje Y muestra los recuentos determinados de forma habitual usando el sistema Elecsys<sup>®</sup> de la compañía Roche Diagnostics.

5 **Figura 6:** Curvas de calibración de un ensayo con vitamina D como se describe en el ejemplo 3 con la composición de reactivo (A) que contiene:

◆: NaOH 10 mM, EDTA 4 mM, DTT 6,7 mM, CE 0,5 M o

10 ▲: NaOH 10 mM, EDTA 4 mM, DTT 6,7 mM o

□: NaOH 10 mM, EDTA 4 mM.

El eje X muestra la concentración en ng/ml, el eje Y muestra los recuentos determinados de forma habitual usando el sistema Elecsys<sup>®</sup> de la compañía Roche Diagnostics.

15 **Figura 7:** Curvas de calibración de un ensayo con vitamina D como se describe en el ejemplo 4, con la composición de reactivo (A) que contiene:

20 O: NaOH 10 mM, EDTA 4 mM, DTT 6,7 mM, CE 0,5 M (véase el ejemplo 1.5) o

◆: NaOH 10 mM, EDTA 4 mM, DTT 6,7 mM, carbonato de dimetilo 0,5 M.

El eje X muestra la concentración en ng/ml, el eje Y muestra los recuentos determinados de forma habitual usando el sistema Elecsys<sup>®</sup> de la compañía Roche Diagnostics.

25 **Figura 8:** Curvas de calibración de un ensayo con vitamina D como se describe en el ejemplo 5, con la composición de reactivo (A) que contiene:

30 ◆: NaOH 10 mM, EDTA 4 mM, DTT 6,7 mM, CE 0,5 M (véase el ejemplo 1.5) o

O: NaOH 10 mM, EDTA 4 mM, DTT 6,7 mM, NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M o

▲: NaOH 10 mM, EDTA 4 mM, DTT 6,7 mM, NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M + etilenglicol 0,5 M o

35 □: NaOH 10 mM, EDTA 4 mM, DTT 6,7 mM.

El eje X muestra la concentración en ng/ml, el eje Y muestra los recuentos determinados de forma habitual usando el sistema Elecsys<sup>®</sup> de la compañía Roche Diagnostics.

40 **Figura 9:** Curvas de calibración de un ensayo con vitamina D como se describe en el ejemplo 4, con la composición de reactivo (A) que contiene:

◆: NaOH 10 mM, EDTA 4 mM, DTT 6,7 mM, CE 0,5 M (véase el ejemplo 1.5) o

45 O: NaOH 10 mM, EDTA 4 mM, DTT 6,7 mM, 1,2-carbonato de glicerol 0,5 M.

El eje X muestra la concentración en ng/ml, el eje Y muestra los recuentos determinados de forma habitual usando el sistema Elecsys<sup>®</sup> de la compañía Roche Diagnostics.

## 50 **Ejemplo 1**

### **Ensayos para la detección de 25-hidroxivitamina D**

55 Se usan ensayos comerciales de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se llevan a cabo las determinaciones de 25-hidroxivitamina D por medio de HPLC (prueba para determinar 25(OH)vitamina D<sub>3</sub>, de la compañía "Immundiagnostik", Bensheim, n.º de referencia KC 3400) o por medio de CL-EM/EM (Vogeser, M. *et al.*, Clin. Chem. 50 (2004) 1415-1417) como se describe en la literatura.

60 En lo que sigue, se describe la preparación de los ingredientes y el procedimiento de prueba general para una nueva prueba:

#### **1.1 Síntesis de éter hidroxivitamina D<sub>2</sub>-3-2'-cianoetilico**

65 Se disuelven 20,6 mg (50 µmol) de 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> (Fluka, n.º 17937) en un matraz de fondo redondo de tres bocas de 25 ml con un termómetro interno en 10 ml de acetonitrilo seco en una atmósfera de argón. Se añaden 1,5 ml de *tert*-butanol/acetonitrilo (9:1) a la solución y se enfría a 6 °C en un baño de hielo. Posteriormente, se

añaden 820 µl de una solución de acrilonitrilo (86 µl de acrilonitrilo en 1,0 ml de acetonitrilo) y se agita durante 15 minutos a 6 °C. A continuación, se añaden 205 µl de una solución de hidruro de potasio (25 mg de KH en 0,5 ml de *terc*-butanol/acetonitrilo 9:1). Se produce una breve floculación, después de la que se obtiene una solución transparente. Se agita la solución de reacción durante otros 45 minutos a 6 °C y posteriormente durante 60 minutos a 4 °C.

Posteriormente, se diluye la solución de reacción con 10 ml de éter metil-*terc*-butílico y se lava dos veces con 10 ml de H<sub>2</sub>O cada vez. Se seca la fase orgánica con aproximadamente 1 g de sulfato de sodio anhidro, se filtra sobre una frita de vidrio G3 y se evapora en un rotavapor. Se seca en alto vacío para formar un residuo transparente viscoso con una masa de aproximadamente 55 mg.

### 1.2 Síntesis de éter hidroxivitamina D<sub>2</sub>-3-3-aminopropílico

Se disuelve todo el nitrilo obtenido anteriormente en 15 ml de éter dietílico y se mezcla con una suspensión de 7,5 mg de hidruro de litio en 7,5 ml de éter dietílico mientras se agita. Se agita la mezcla de reacción durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de esto, se añade una suspensión de 38,4 de hidruro de litio y aluminio en 6,6 ml de éter dietílico. Esto da como resultado una fuerte turbidez de la mezcla. Se agita la mezcla de reacción durante otra hora a temperatura ambiente, a continuación, se enfría la mezcla de reacción a 0-5 °C en un baño de hielo y se añaden cuidadosamente 35 ml de agua. Se hace que el pH sea fuertemente básico por adición de 6,6 ml de solución de hidróxido de potasio 10 M.

Se extrae tres veces con 65 ml de éter metil-*terc*-butílico cada vez. Se secan las fases orgánicas combinadas usando aproximadamente 5 g de sulfato de sodio anhidro, se filtran y se evaporan a temperatura ambiente en un rotavapor. Se seca el residuo hasta una constancia en la masa usando una bomba de aceite. Se disuelve el producto bruto en 5 ml de DMSO y 3,0 ml de acetonitrilo y se purifica por medio de HPLC preparativa.

eluyente A = Millipore-H<sub>2</sub>O + ácido trifluoroacético al 0,1 %;

eluyente B = acetonitrilo al 95 % + Millipore-H<sub>2</sub>O al 5 % + TFA al 0,1 %;

gradiente: de un 50 % de B a un 100 % de B en 100 min

caudal: 30 ml/min

temperatura: temperatura ambiente

dimensión de la columna: ø = 5,0 cm; L = 25 cm

material de la columna: Vydac C18/300 Å/15-20 µm

longitud de onda det.: 226 nm

Se agrupan las fracciones con contenido de producto mayor de un 85 % de acuerdo con la HPLC analítica (Vydac C18/300 Å/5 µm, 4,6 x 250 mm) en un matraz de fondo redondo y se liofilizan. Se obtienen 13,7 mg (rendimiento: 58 %) como un liofilizado incoloro.

### 1.3 Síntesis del conjugado éter hidroxivitamina D<sub>2</sub>-3-3'-N-(hemisuberil)aminopropílico-biotina-(beta-Ala)-Glu-Glu-Lys(épsilon) (= Ag-bi)

Se disuelven 13,7 mg (25 µmol) de éter hidroxivitamina D<sub>2</sub>-3-3'-aminopropílico en 3,5 ml de DMSO, se añaden 28,7 mg (30 µmol) de biotina-(beta-Ala)-Glu-Glu-Lys(épsilon)-éster de hemi-suberato-N-hidroxisuccinimida (Roche Applied Science, n.º 11866656) y 12,5 µl de trietilamina y se agita durante la noche a temperatura ambiente. Se diluye la solución de reacción con 4,5 ml de DMSO, se filtra a través de un microfiltro de 0,45 µm y se purifica posteriormente por medio de HPLC preparativa (para las condiciones, véase el ejemplo 2.3b)). Se agrupan las fracciones que contienen más de un 85 % de producto de acuerdo con la HPLC analítica y se liofilizan. Se obtienen 9,8 (rendimiento: 30 %) de conjugado de biotina purificado.

### 1.4 Rutenilación de la proteína de unión a la vitamina D y purificación por cromatografía de filtración en gel

Se transfiere la proteína de unión a la vitamina D a un tampón fosfato de potasio 100 mM/cloruro de sodio 150 mM, pH 8,5, y se ajusta la concentración de proteína a 5-10 mg/ml. Se disuelve el reactivo de rutenilación (éster de tris(bipiridil)-N-hidroxisuccinimida-rutenio(II)) en DMSO y se añade a la solución de anticuerpo en una proporción molar de 3 a 1. Después de un tiempo de reacción de 45 min, se detiene la reacción por adición de 1-lisina y se purifica la proteína de unión a la vitamina D rutenilada (=DBP-Ru) por filtración en gel en una columna Superdex 200.

**1.5 Procedimiento de prueba en el ensayo**

Se mide la muestra que se va a investigar usando el sistema Elecsys® de la compañía Roche Diagnostics.

- 5 Se forma la mezcla de reactivo mezclando una muestra que se va a investigar con la composición de reactivo (A) y un agente alcalinizante (B).

10 En este ejemplo, se forma la mezcla de reactivo de 15 µl de muestra mezclada con 15 µl de la composición de reactivo (A) y 10 µl del agente alcalinizante (B). Se incuba la mezcla de reactivo durante 9 minutos. En la siguiente etapa, se añaden 70 µl de reactivo de detección (solución C) a la mezcla de reactivo y se incuba durante otros 9 minutos. En la última etapa, se añaden antígeno de pared biotinilado (solución D) (60 µl), así como 30 µl de partículas de poliestireno magnetizables recubiertas con estreptavidina (ES) (30 µl) (suspensión E). Después de otros 9 minutos de incubación, se determina de forma habitual la cantidad de proteína de unión a la vitamina D rutenilada unida (véanse las fig. 1, 2, 3, 4a, 4b).

15 La composición de reactivo (A) contiene:

10 mM	NaOH
4 mM	EDTA
6,7 mM	ditiotreitól (DTT)
0,5 M	carbonato de etileno (CE)
pH 5,5	

20 El agente alcalinizante (B) contiene:

1,375 M	NaOH
---------	------

La solución C con la proteína de unión a la vitamina D rutenilada (DBP-Ru) contiene:

0,2 M	bis-tris-propano (pH 7,5)
2,5 %	seroalbúmina humana (SAH)
50 mM	NaCl
1 %	manitol
0,1 %	oxipiriona
0,12 µg/ml	DBP-Ru

25 La solución D con el antígeno de pared biotinilado contiene:

0,2 M	bis-tris-propano (pH 8,6)
0,5 %	solución de tween-20
0,1 %	oxipiriona
30 ng/ml	biotina
0,0108 µg/ml	Ag-bi (del ejemplo 1.1)

La suspensión E con partículas de látex recubiertas con ES contiene:

0,72 mg/ml	Partículas de poliestireno magnetizables recubiertas con ES que tienen una capacidad de unión de 470 ng/ml.
------------	---

30

**Ejemplo 2**

**Comparación del éster de carbonato con una sal de metal, un tampón fosfato y un carbonato**

Se mide la muestra que se va a investigar usando el sistema Elecsys® de la compañía Roche Diagnostics. Se muestra el procedimiento de ensayo total en el ejemplo 1.5.

5 A distinción del ejemplo 1.5, la composición de reactivo (A) contiene carbonato de etileno (CE) 0,5 M, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M, NaCl 0,5 M o bien NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 M, respectivamente.

Composición de reactivo (A):

10 mM	NaOH
4 mM	EDTA
6,7 mM	DTT
0,5 M	de CE, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , NaCl o bien NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

10 Como control se ha usado una composición de reactivo (A) que contiene NaOH 10 mM, EDTA 4 mM, DTT 6,7 mM. Los resultados se muestran en la figura 5. El éster de carbonato (CE 0,5 M (◆)) presente en el pretratamiento alcalino (mezcla de reactivo) provoca un efecto de potenciación de la señal en el ensayo competitivo. Especialmente, se mejora la dinámica de la señal en comparación con una prueba sin CE (□). Una sal (NaCl 0,5 M, (◇)) no muestra ningún efecto. La adición de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M (O) o NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 M (▲) muestra un leve efecto en la  
15 señal.

### Ejemplo 3

#### **Pretratamiento alcalino con/sin éster de carbonato**

20 Se mide la muestra que se va a investigar usando el sistema Elecsys® de la compañía Roche Diagnostics. Se muestra el procedimiento de ensayo en el ejemplo 1.5.

A distinción del ejemplo 1.5, se han preparado tres composiciones de reactivo diferentes que contienen:

25 ◆: NaOH 10 mM, EDTA 4 mM, DTT 6,7 mM, CE 0,5 M (véase el ejemplo 1.5) o bien

▲: NaOH 10 mM, EDTA 4 mM, DTT 6,7 mM o bien

30 □: NaOH 10 mM, EDTA 4 mM.

Después de una incubación como pretratamiento de 4 min de la muestra + ◆ (composición de reactivo (A) + agente alcalinizante (B) como se describe en el ejemplo 1.5), ▲, o bien □, respectivamente, (= mezcla de reactivo) y antes de la adición de la solución C, se ha fijado el pH de la mezcla de reactivo a pH 9 por adición de bis-tris-propano, pH 6,3 (fig. 6). El éster de carbonato CE presente en el pretratamiento alcalino (mezcla de reactivo) provoca un efecto de potenciación de la señal en el ensayo competitivo. Especialmente, se mejora la dinámica de la señal en comparación con una prueba sin CE.

### Ejemplo 4

#### **Carbonato de etileno frente a carbonato de dimetilo**

Se mide la muestra que se va a investigar usando el sistema Elecsys® de la compañía Roche Diagnostics. Se muestra el procedimiento de ensayo en el ejemplo 1.5.

45 A distinción del ejemplo 1.5, se han preparado dos composiciones de reactivo (A) diferentes que contienen:

O: NaOH 10 mM, EDTA 4 mM, DTT 6,7 mM, CE 0,5 M (véase el ejemplo 1.5) o bien

50 ◆: NaOH 10 mM, EDTA 4 mM, DTT 6,7 mM, carbonato de dimetilo 0,5 M.

Tanto el éster de carbonato, el carbonato de etileno como el carbonato de dimetilo, respectivamente, muestran el mismo rendimiento en el ensayo (fig. 7).

### Ejemplo 5

#### **Efecto de los productos de la hidrólisis de carbonato de etileno**

60 Se mide la muestra que se va a investigar usando el sistema Elecsys® de la compañía Roche Diagnostics. Se muestra el procedimiento de ensayo en el ejemplo 1.5.

A distinción del ejemplo 1.5, se han preparado cinco composiciones de reactivo (A) diferentes que contienen:

5 ◆: NaOH 10 mM, EDTA 4 mM, DTT 6,7 mM, CE 0,5 M (véase el ejemplo 1.5) o bien

O: NaOH 10 mM, EDTA 4 mM, DTT 6,7 mM, NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M o bien

▲: NaOH 10 mM, EDTA 4 mM, DTT 6,7 mM, NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M + etilenglicol 0,5 M

10 □: NaOH 10 mM, EDTA 4 mM, DTT 6,7 mM.

El producto de la hidrólisis alcalina de CE es etilenglicol, que no tiene ninguna influencia en el ensayo (▲). Una sal de hidrogenocarbonato (NaHCO<sub>3</sub>) también muestra un efecto de potenciación de la señal, pero no tanto como un éster de carbonato (fig. 8).

15 **Ejemplo 6**

**Carbonato de etileno frente a 1,2-carbonato de glicerol**

20 Se mide la muestra que se va a investigar usando el sistema Elecsys® de la compañía Roche Diagnostics. Se muestra el procedimiento de ensayo en el ejemplo 1.5.

A distinción del ejemplo 1.5, se han preparado dos composiciones de reactivo (A) diferentes que contienen:

25 ◆: NaOH 10 mM, EDTA 4 mM, DTT 6,7 mM, CE 0,5 M (véase el ejemplo 1.5) o bien

O: NaOH 10 mM, EDTA 4 mM, DTT 6,7 mM, 1,2-carbonato de glicerol 0,5 M.

30 Tanto el éster de carbonato, el carbonato de etileno como el 1,2-carbonato de glicerol, respectivamente, muestran el mismo rendimiento en el ensayo (fig. 9).

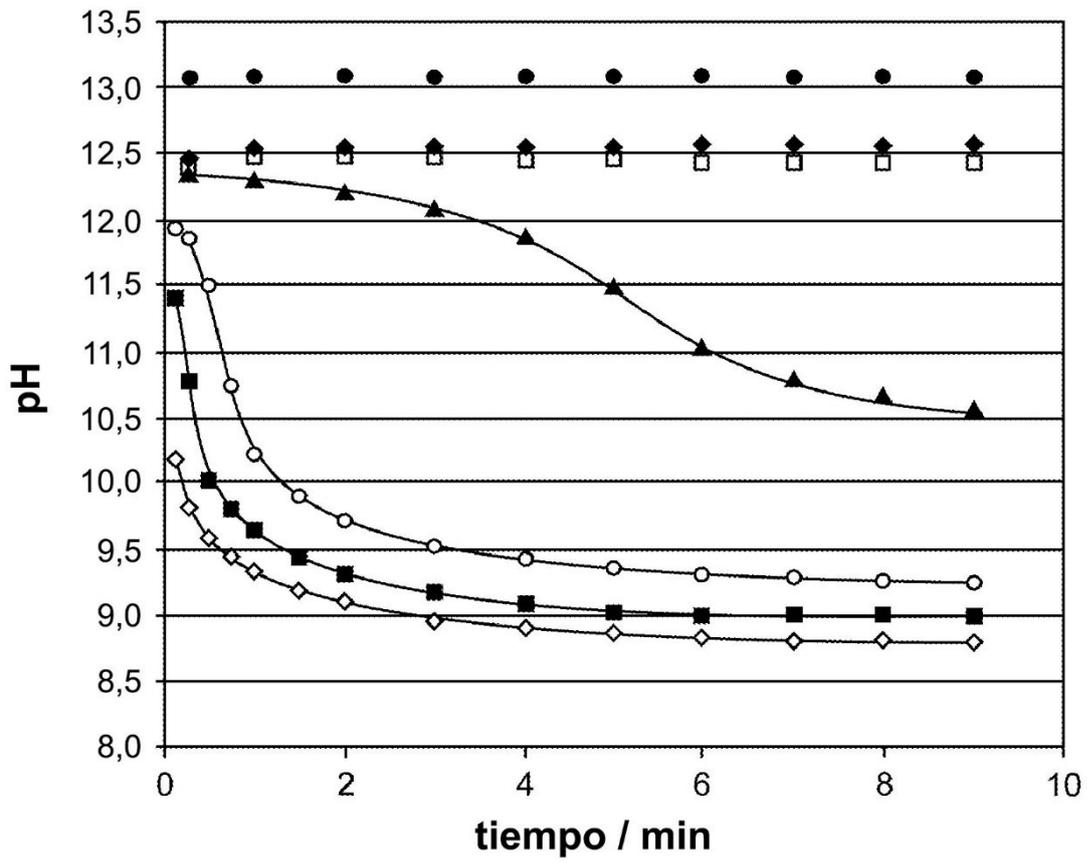
## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para liberar un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D que comprende la etapa de:
- 5 a) proporcionar una muestra que se va a investigar y
- b) mezclar la muestra de la etapa (a) con
- 10 i) un reactivo que comprende una sal de hidrogenocarbonato,
- ii) un agente reductor y
- 15 iii) un agente alcalinizante,
- liberando, de este modo, el compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D.
2. Un procedimiento *in vitro* para liberar un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D que comprende la etapa de:
- 20 a) proporcionar una muestra que se va a investigar y
- b) mezclar la muestra de la etapa (a) con
- 25 i) un reactivo que comprende una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis,
- ii) un agente reductor y
- 30 iii) un agente alcalinizante,
- liberando, de este modo, el compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D.
3. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el reactivo de acuerdo con la etapa (i) es soluble en una solución acuosa en las condiciones apropiadas para liberar un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D.
- 35 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el reactivo de acuerdo con la etapa (i) contiene una sal de hidrogenocarbonato en una concentración de 0,1 M a 2,0 M.
- 40 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el reactivo de acuerdo con la etapa (i) contiene una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis en una concentración de 0,1 M a 2,0 M.
- 45 6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 y 5, en el que la sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) tras la hidrólisis es un éster de carbonato cíclico o no cíclico o un derivado hidroxilado o halogenado del mismo, respectivamente.
- 50 7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la muestra es una muestra líquida.
8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la muestra es sangre, suero o plasma.
- 55 9. Un procedimiento *in vitro* para medir un compuesto de vitamina D que comprende las etapas de:
- a) liberar un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D de acuerdo con el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y
- 60 b) medir el compuesto de vitamina D liberado en la etapa (a).
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el compuesto de vitamina D se selecciona del grupo que consiste en 25-hidroxivitamina  $\text{D}_2$ , 25-hidroxivitamina  $\text{D}_3$ , 24,25-dihidroxivitamina  $\text{D}_2$ , 24,25-dihidroxivitamina  $\text{D}_3$  y epi en C3 de 25-hidroxivitamina D.
- 65 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que se determinan los compuestos de vitamina D

25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> y/o 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>.

- 5 12. Uso de una composición de reactivo para la liberación de un compuesto de vitamina D de la proteína de unión a la vitamina D, que comprende una sustancia seleccionada del grupo que consiste en una sal de hidrogenocarbonato o una sustancia que pueda liberar iones hidrogenocarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) tras la hidrólisis en una concentración de 0,1 M a 2,0 M y un agente reductor.
- 10 13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado por que el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en 2-mercaptoetanol, 2-mercaptoetilamina-HCl, TCEP, cisteína-HCl, ditioneitol (DTT), N-metilmaleimida, reactivo de Ellman y ácido 1,2-ditioneolano-3-carboxílico.
14. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado por que el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en 2-mercaptoetanol, 2-mercaptoetilamina-HCl, TCEP, cisteína-HCl y ditioneitol (DTT).
- 15 15. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, caracterizado por que el agente reductor tiene una concentración de 2 mM a 30 mM.

Fig. 1



**Fig. 2**

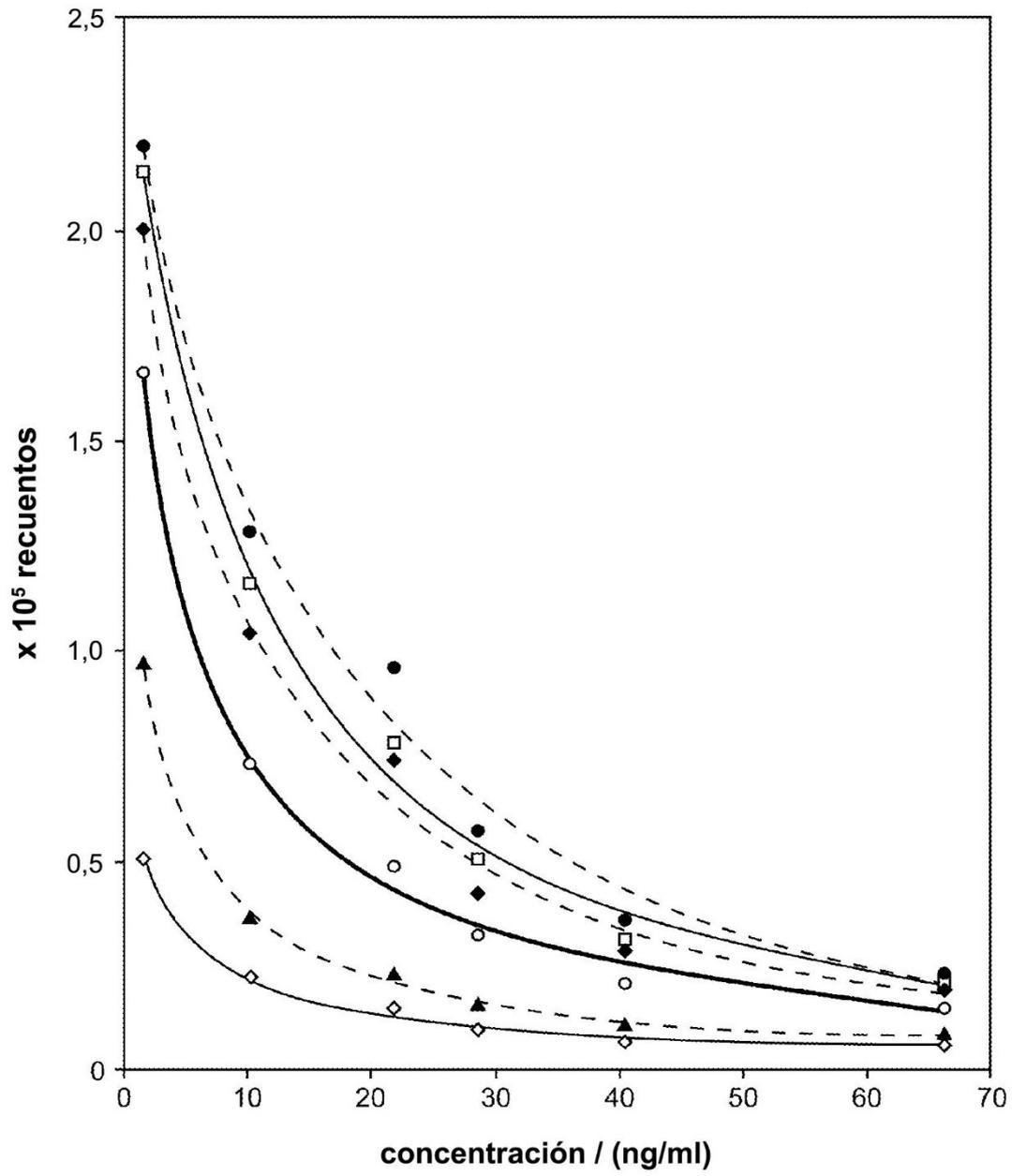


Fig. 3

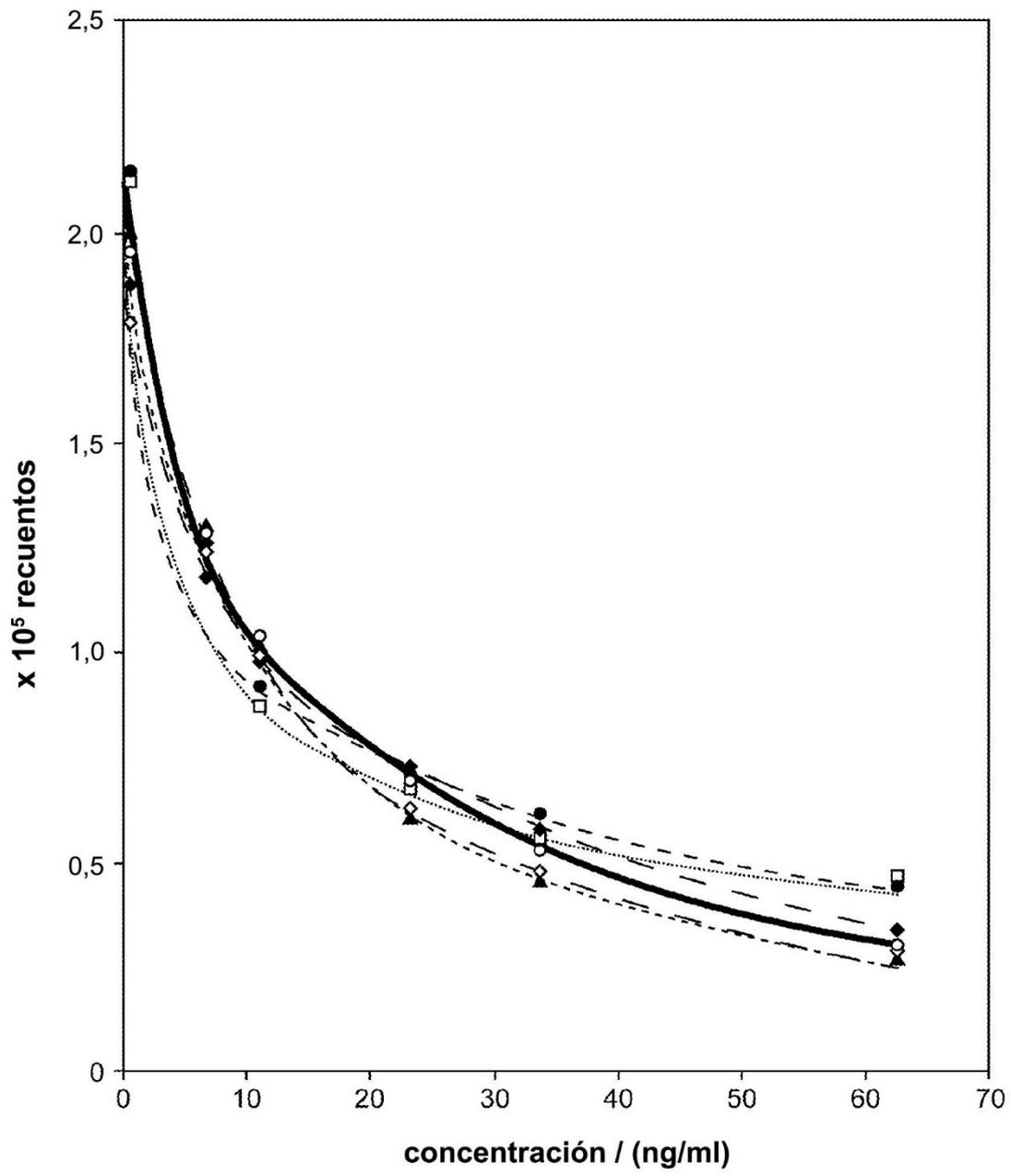
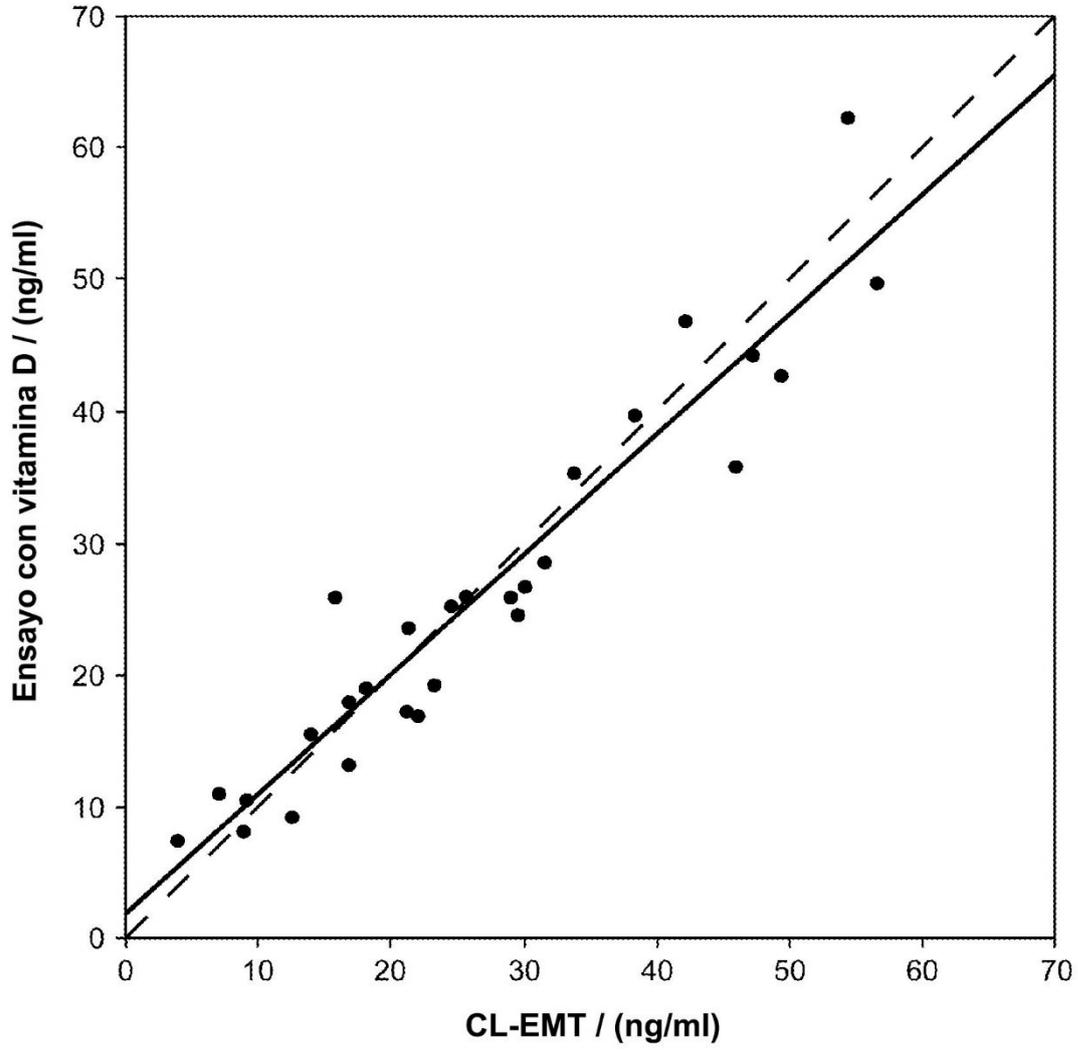
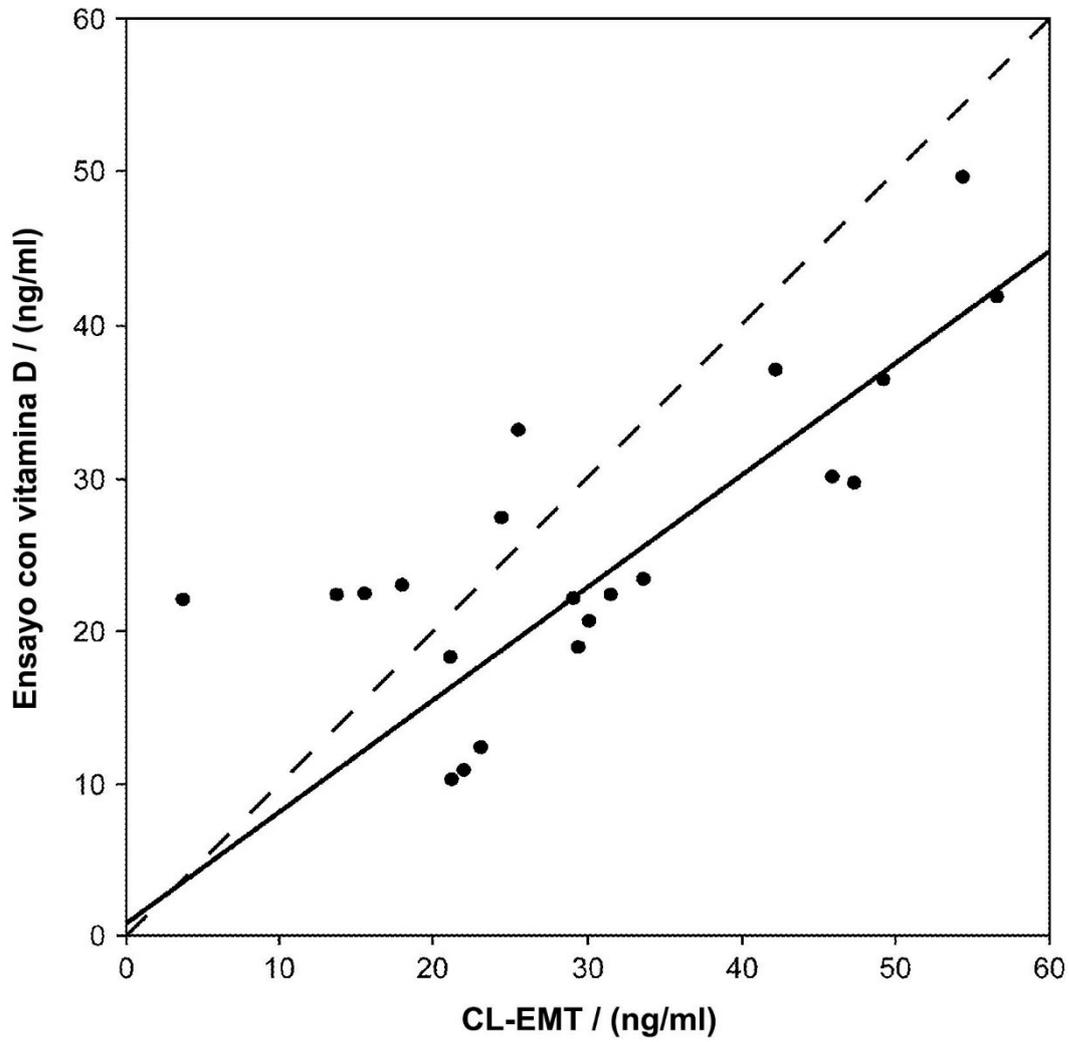


Fig. 4 a



**Fig. 4 b**



**Fig. 5**

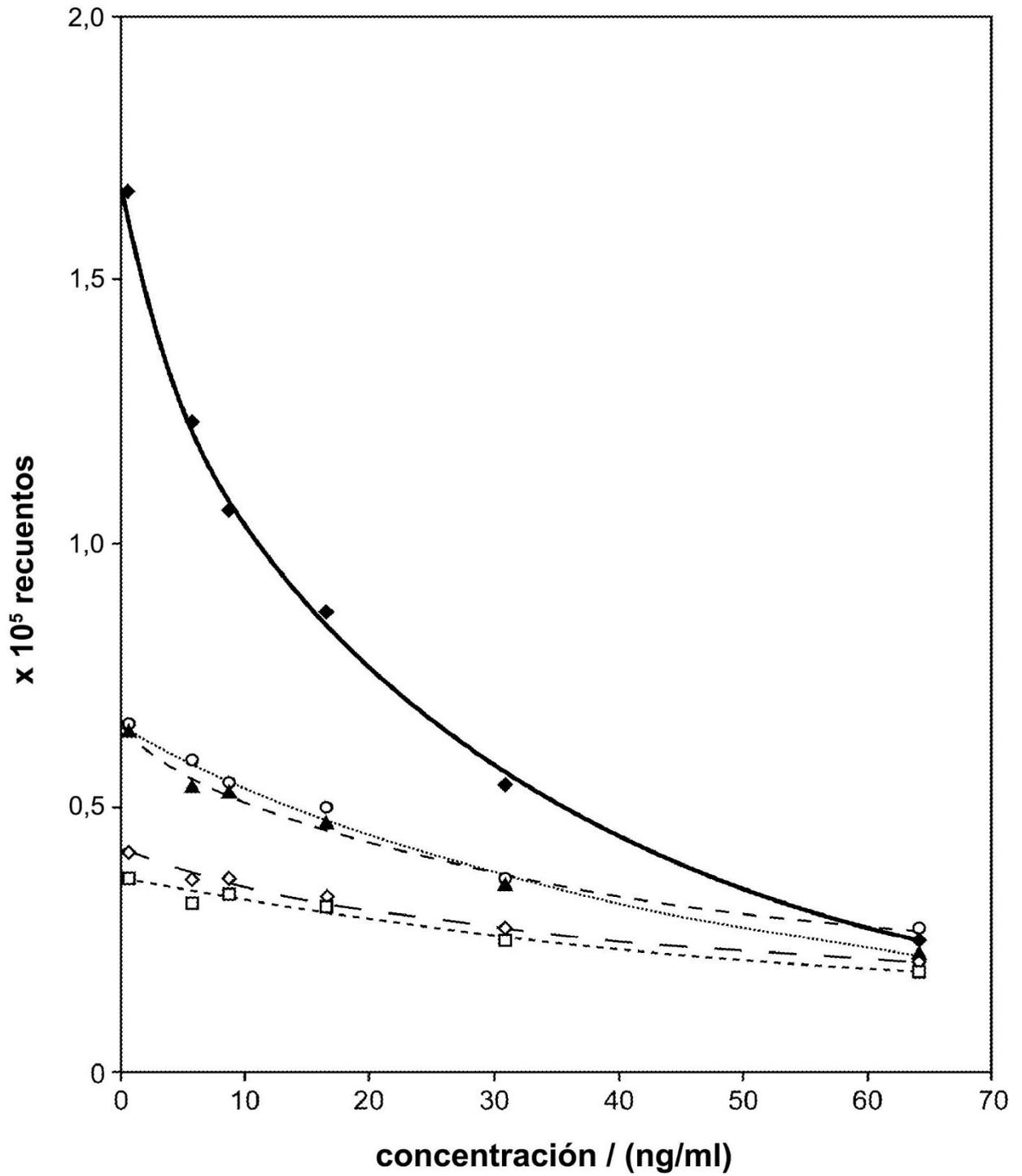
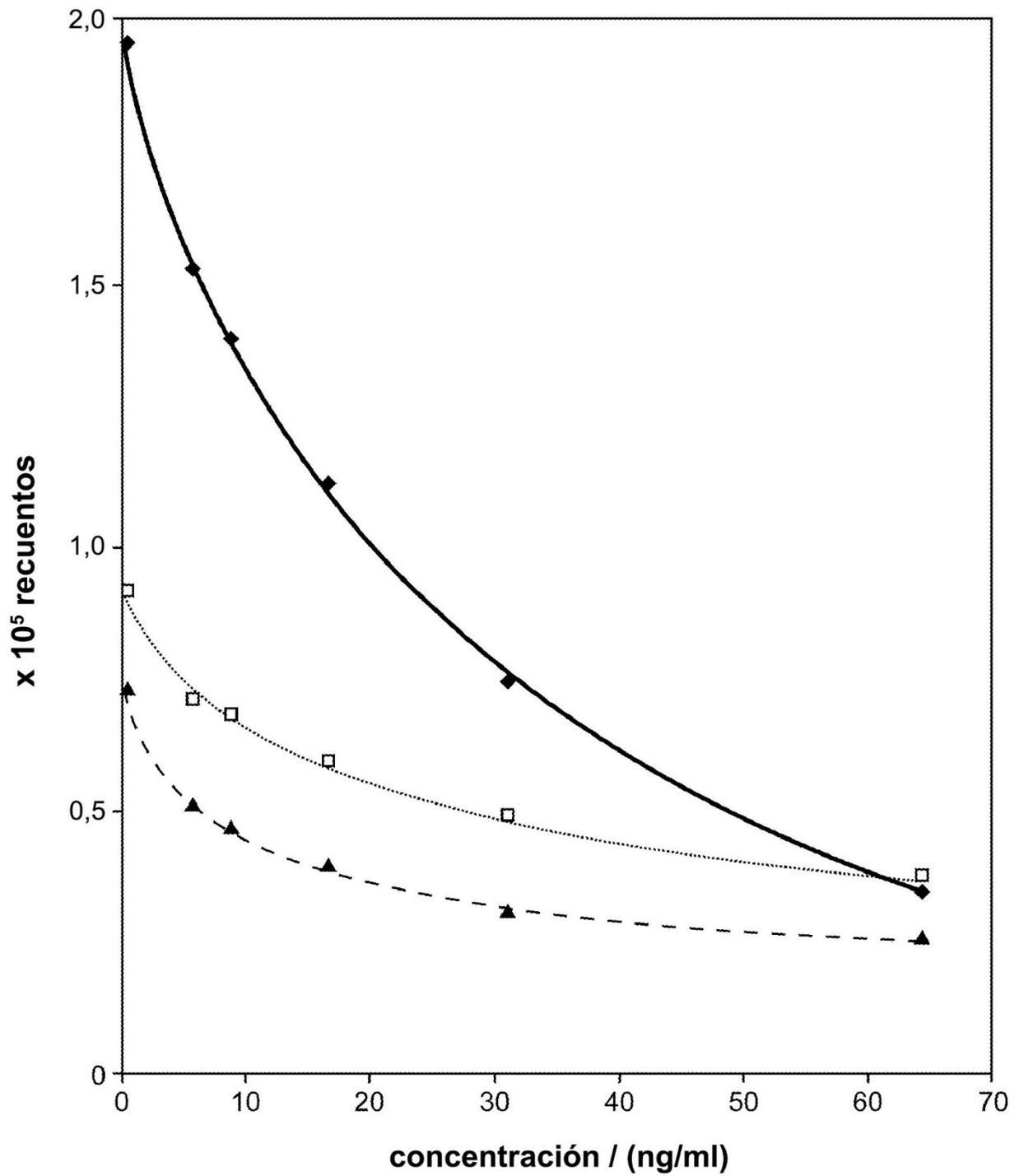


Fig. 6



**Fig. 7**

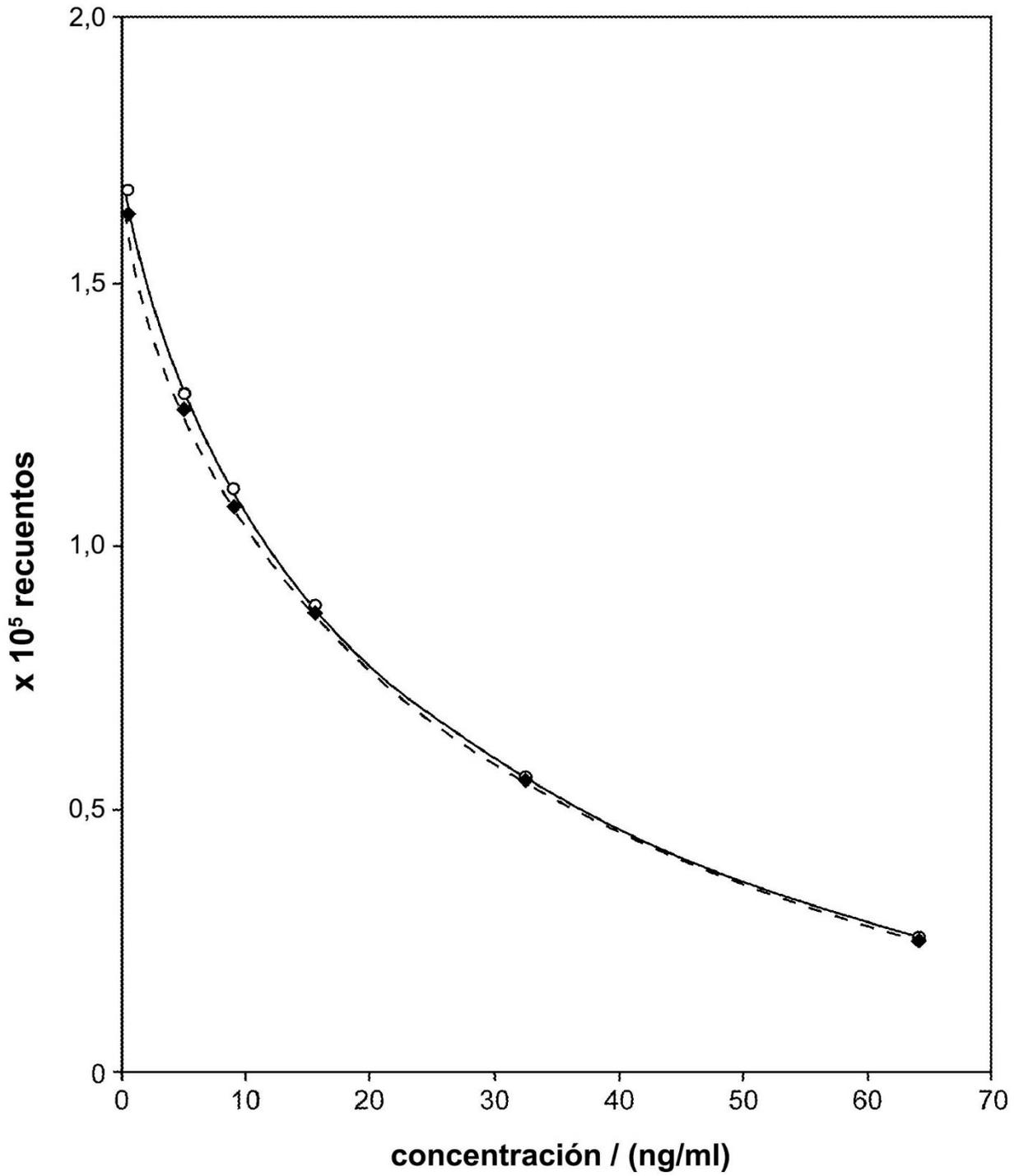
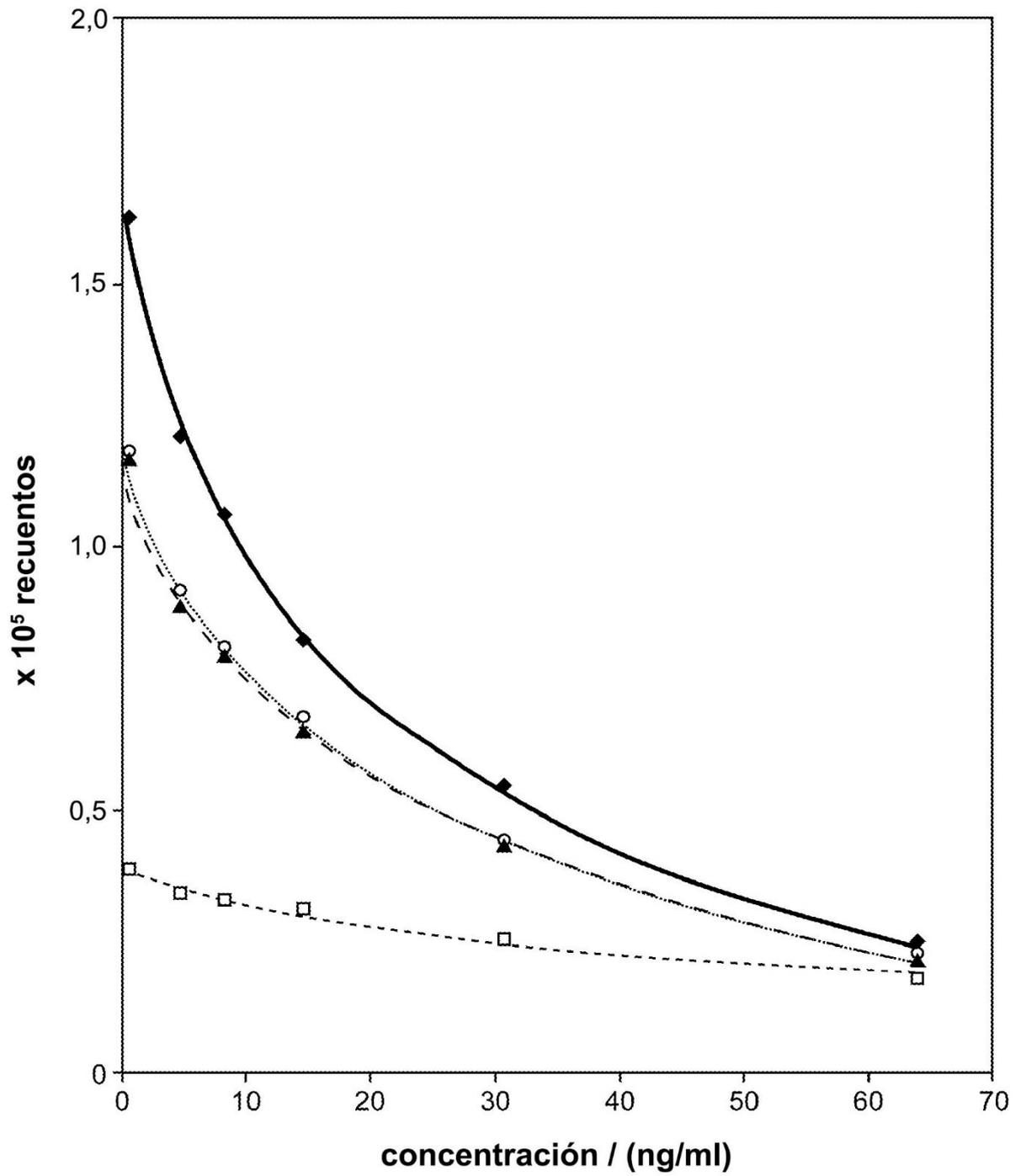


Fig. 8



**Fig. 9**

