

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 927 217**

51 Int. Cl.:

G01N 33/82

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.01.2019 PCT/EP2019/050121**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.07.2019 WO19134948**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.01.2019 E 19700082 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2022 EP 3735591**

54 Título: **Método de medición del estado de vitamina D endocítica**

30 Prioridad:

03.01.2018 DE 102018100096

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

03.11.2022

73 Titular/es:

**IMMUNDIAGNOSTIK AG (100.0%)
Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, DE**

72 Inventor/es:

**ARMBRUSTER, FRANZ PAUL y
SCHAEFER, LILIANA**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 927 217 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

Método de medición del estado de vitamina D endocítica

5 Campo de la invención

La presente solicitud se refiere a ensayos que involucran materiales biológicos de una naturaleza específica y, en particular, a un ensayo para medir la concentración de vitamina D endocitable en una muestra biológica de un sujeto, en particular sangre o suero, y para la detección o diagnóstico de enfermedades o estados relacionados con estado de vitamina D en sangre o suero (G01N 2333/00, G01N2800/00)

Antecedentes de la invención

La ruta metabólica que conduce a la síntesis de vitamina D activa implica tres reacciones que se producen en diferentes tejidos. En seres humanos, la síntesis se inicia en la piel con una escisión mediada por luz UV para producir colecalciferol (vitamina D₃, VD₃). El otro isómero de vitamina D "ergocalciferol" (vitamina D₂, VD₂) se produce en las plantas y se absorbe con los alimentos. Ambos isómeros de vitamina D se metabolizan en el hígado a 25-hidroxivitamina D [25(OH)D], que también es la principal forma circulatoria (prohormona). Esta segunda etapa se cataliza mediante una enzima del citocromo P450, una reductasa de hemoproteína NAPH, mientras que la identidad de la 25-hidroxilasa hepática todavía requiere más aclaración. La 25(OH)D luego se hidroxila en 1α en el riñón a 1α,25-dihidroxivitamina D o calcitriol, que es la forma fisiológicamente activa (hormona D). El calcitriol regula la absorción de calcio en los intestinos, la mineralización de los huesos, la diferenciación de los osteoblastos, la síntesis de la matriz ósea y las funciones neuromusculares. Es de conocimiento médico común que los niveles de 25(OH)D en suero menores de 15 ng por ml de suero (37,5 nmol/l) provocan un aumento del nivel de la hormona paratiroidea y conducen a un aumento de la resorción ósea (Chapuy MC *et al.* en J Clin Endocrinol Metab 1996; 81:1129-33). Una deficiencia de vitamina D puede estar provocada por enfermedades gastrointestinales, disfunción hepática, metabolismo elevado inducido por malabsorción de fármacos, defectos genéticos o exposición insuficiente a la luz solar. La deficiencia de vitamina D es un factor de riesgo conocido para la osteoporosis senil. En general, una deficiencia de menos de 5 ng de 25(OH)D por ml de suero (12,5 nmol/l) se considera grave y provoca raquitismo en niños y osteomalacia en adultos (Scharla *et al.* Exp Clin Endocrinol. Diabetes, 1996, 104:289-292). El exceso de vitamina D debido a una sobredosis provoca hipercalcemia. No está claro si existe una diferencia definitiva entre los efectos de VD₂ y VD₃ o si son igualmente efectivos en la elevación de la 25(OH)D sérica, particularmente a dosis más bajas de vitamina D (véase: Tripkovic L *et al.*, Am J Clin Nutr. Junio de 2012; 95(6): 1357-1364; Am J Clin Nutr. Agosto de 2017;106(2):481-490).

La proteína de unión a vitamina D (DBP) es un miembro de la superfamilia de los albuminoides. La glucoproteína de 56-58 kDa puede unirse a los metabolitos de vitamina D, así como a los ácidos grasos y otras endotoxinas. Se piensa que la DBP actúa como reservorio en situaciones de deficiencia, aumentando la semivida de la vitamina D, pero también protege frente a la intoxicación por vitamina D. La concentración de DBP en sangre se mantiene estable dentro de un intervalo relativamente estrecho (323-460 mg/l (5,52-7,93 mol/l)) en sujetos normales, incluso en estados patológicos y trastornos del metabolismo del calcio. Excepto en el embarazo, no se han observado concentraciones altas de DBP. La DBP en suero puede medirse mediante numerosos métodos, incluyendo la inmunoturbidimetría (Hamashima *et al.*, Clinica Chimica Acta 321 (2002) 23-28). Se sabe que DBP produce efectos quimiocinéticos en los granulocitos de los neutrófilos, activa los macrófagos y secuestra la actina tras el daño tisular.

El nivel de DBP en el suero es aproximadamente 20 veces mayor que el de la vitamina D y, por tanto, los metabolitos de vitamina D sólo ocuparán del 2 al 5%. Para la medición, los metabolitos de vitamina D se liberan de DBP por digestión enzimática, desnaturalización y/o desplazamiento de ligandos (documentos EP 2 126 586 B1, WO 99/67211; EP 0 753 743, WO 2004/063704). Los agentes de liberación incluyen todo tipo de detergentes y tensioactivos (documento EP 2 955 516 B1) así como análogos estructurales de la vitamina D tales como warfarina, compuestos salicílicos, determinados ácidos sulfónicos, ácidos toluenosulfónicos, ácido naftalenosulfónico, ácidos anilina-naftalenosulfónicos, etc. (documento WO 03/023391). La liberación de vitamina D de DBP es una etapa decisiva en la mayoría de los procedimientos de laboratorio, en particular porque los metabolitos de vitamina D son hidrófobos y similares al colesterol, unidos por numerosas proteínas séricas, por lo que su determinación cuantitativa es técnicamente difícil y los resultados están abiertos a interpretación. La confusión en cuanto al estado de la vitamina D dio lugar a una iniciativa de colaboración liderada por la Oficina de Suplementos Dietéticos de los Institutos Nacionales de Salud de EE.UU. y recientemente ha habido propuestas para evaluar el estado de la vitamina D a través de la determinación de la "25(OH)D libre" en suero, digamos que la 25(OH)D no se une a DBP o albúmina (para revisión: The Importance of 25-Hydroxyvitamin D Assay Standardization and the Vitamin D Standardization Program. J AOAC Int. 2017, 100(5):1223-1224; y Malmstroem S *et al.*, J AOAC Int. 2017, 100(5):1323-7). La técnica anterior adicional está contenida en Hyun-Jeong Kim *et al.*, Clinical Utility of Measurement of Vitamin D-Binding Protein and Calculation of Bioavailable Vitamin D in Assessment of vitamin D Status, Ann Lab Med 2017, 37; 34-38 y en el artículo de Nykjaer A *et al.* en An endocytic pathway essential for the renal uptake and activation of the steroid 25-(OH)-vitamin D3, Cell 1999, 96:507-515.

El calcio y el fósforo son minerales esenciales necesarios para muchas funciones biológicas críticas, incluyendo la

señalización celular, el metabolismo energético, el crecimiento y la integridad del esqueleto. La homeostasis del calcio y el fosfato se mantiene principalmente mediante la regulación del cotransporte epitelial de calcio y fosfato en el riñón y el intestino, procesos que están estrechamente regulados por hormonas tales como el calcitriol, el factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23) y la hormona paratiroidea (PTH). En pacientes con enfermedad renal crónica (ERC), a medida que disminuye la función renal, la interrupción de los bucles de retroalimentación entre estas hormonas tiene consecuencias adversas en varios sistemas de órganos, incluyendo el esqueleto, el corazón y el sistema vascular. Las complicaciones incluyen calcificación vascular, accidente cerebrovascular, fractura esquelética y mayor riesgo de muerte. El aumento de las concentraciones de FGF23 y PTH y la deficiencia de vitamina D contribuyen a la patogenia. Por tanto, el tratamiento de los pacientes se centra en restablecer los bucles de retroalimentación para mantener el equilibrio normal de calcio y fosfato para prevenir complicaciones esqueléticas y cardiovasculares. La evidencia reciente vincula aún más el estado de la vitamina D con trastornos tales como el cáncer, la diabetes, la depresión, etc., lo que conduce a una mayor demanda de pruebas de rutina para los niveles de vitamina D, incluso en pacientes sanos. Por tanto, no puede subestimarse la importancia del estado de la vitamina D en la investigación y la salud y los laboratorios clínicos se enfrentan al desafío de aumentar el número de pruebas y la necesidad de identificar a las personas que realmente padecen de un nivel bajo de vitamina D. El estado de la técnica representa un problema.

Sumario de la invención

La solicitud proporciona un ensayo y un método para medir el nivel efectivo de vitamina D (incluyendo los metabolitos de vitamina D de la forma de almacenamiento) en una muestra de líquido corporal en presencia de proteína de unión a vitamina D (DBP), que comprende las etapas de a) poner en contacto dicha muestra con megalina/LRP2 (*proteína relacionada con lipoproteínas de baja densidad 2*) y/o un fragmento soluble del mismo en condiciones de unión para formar un complejo que contiene DBP, vitamina D o un metabolito del mismo y megalina/LRP2 o un fragmento del mismo; b) determinar la cantidad de DBP:vitamina D y/o cualquiera de sus componentes; y c) relacionar la cantidad de complejo DBP:vitamina D unido a megalina con el estado de vitamina D efectivo en dicho sujeto.

En una realización preferida, el ensayo y el método comprenden el uso de un fragmento de megalina que no se une a ninguno de los otros ligandos de megalina/LRP2 y/o una proteína de fusión con dicho fragmento de megalina que puede unirse al complejo DBP:VD. Una realización preferida de dicho método comprende una medición diferencial de colecalciferol hidroxilado (25-hidroxivitamina D₃) en presencia de ergocalciferol hidroxilado (25-hidroxivitamina D₂), 24,25-dihidroxivitamina D₂ y/o 24,25-dihidroxivitamina D₃.

La divulgación abarca el uso de DBP endógena presente en el suero, pero puede incluir la adición de DBP para obtener una concentración convencional de DBP en las muestras de prueba. La divulgación puede abarcar además el contacto adicional de dicha muestra con cubilina y/o un fragmento soluble de la misma, ya que se sabe que cubilina facilita el proceso endocítico (Nykjaer A, *et al.* Cubilin dysfunction causes abnormal metabolism of the steroid hormone 25(OH) vitamin D₃. PNAS U.S.A. (2001) 98(24):13895-900 [PUBMED: 11717447]).

En una realización, la cantidad de DBP:VD unido por megalina se determina mediante turbidimetría o nefelometría o, en particular, mediante un inmunoensayo para DBP. En otra realización, la megalina y/o dicho fragmento soluble de la misma pueden unirse a partículas o perlas que tienen diámetros que oscilan entre 50 y 200 nm. Alternativamente, la divulgación enseña para completar un inmunoensayo seleccionado del grupo ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas), RIA (radioinmunoensayo), FIA (inmunoensayo de fluorescencia), LIA (inmunoensayo de luminiscencia) o ILMA.

En otra realización, el método puede comprender las etapas de (a) proporcionar una cantidad definida de megalina y/o un fragmento de la misma acoplado a una fase sólida; (b) poner en contacto la muestra con una fase sólida; (c) crear condiciones para permitir la unión de megalina y/o un fragmento de la misma al complejo formado entre DBP y el metabolito de vitamina D, en el que la DBP sola no se une a megalina y/o un fragmento de la misma; y lavar la fase sólida; (e) proporcionar un anticuerpo que reconoce el complejo DBP:VD o, facultativamente, megalina o un fragmento soluble de la misma; (f) poner en contacto dicha megalina y/o fragmento de la misma unido a DBP:VD con un anticuerpo anti-DBP y, opcionalmente, inmovilizar el complejo en la fase sólida; y (g) determinar la cantidad de anticuerpo unido a la fase sólida y cuantificar el estado de vitamina D en plasma o suero por correlación con una referencia.

La divulgación también proporciona un kit de prueba que comprende un anticuerpo específico para DBP y una pareja de unión que comprende megalina o un fragmento de la misma. El anticuerpo puede ser uno que se une a DBP o al metabolito de vitamina D en dicho complejo. En otra realización, el kit de prueba puede comprender nanopartículas que tienen megalina unida y/o fragmentos solubles de la misma.

El objeto declarado se logra porque la divulgación proporciona un método para la determinación cuantitativa directa del estado de vitamina D efectivo en suero o plasma. El estado se basa en el principal metabolito de vitamina D circulante que está listo para la endocitosis y la internalización en las células del riñón, o en las células que tienen una ruta de transporte de megalina endocítica, de modo que la prohormona (25(OH)D) se hidroxilará en 1a a la

hormona D fisiológicamente activa (calcitriol). Como el ergocalciferol y el colecalciferol se unen ambos a DBP pero el complejo DBP:VD₃ se une predominantemente a megalina, el método dado a conocer proporciona un estado de prohormona capaz de convertirse en la hormona activa. Los metabolitos de vitamina D tales como 24,25(dihidroxi)vitamina-D₃, si bien todavía pueden formar un complejo con DBP, están o bien mucho menos ligados a la megalina o bien su concentración es demasiado baja en la circulación para afectar el estado de vitamina D efectivo determinado.

El complejo DBP:VD₃ sólo se somete a endocitosis por la ruta de megalina-cubilina en las células en las que la P450 1a-hidroxilasa (Cyp27B1) se encuentra en el exterior de la membrana mitocondrial. Por consiguiente, otros metabolitos de vitamina D no se activarán o su concentración en la circulación es demasiado baja para ser relevante con respecto al estado de vitamina D medido. Esto se aplica en particular al ergocalciferol 25-hidroxilado [25(OH)D₂] cuyo complejo con DBP no está, o está mucho menos ligado a megalina (véase la figura 8B). Por tanto, la presente divulgación contradice la hipótesis de la hormona libre según la cual sólo la fracción no unida a proteínas (la fracción libre) de los metabolitos de vitamina D puede entrar en las células y ejercer efectos biológicos.

La determinación del estado de vitamina D efectivo puede realizarse en disolución acuosa a pesar de la naturaleza lipófila de los metabolitos de vitamina D. No es necesario liberar los metabolitos de vitamina D de sus parejas de unión (DBP, albúmina, proteínas de la superfamilia albuminoide, etc.) ya que el método se basa en la medición del complejo DBP:VD que se unirá o discriminará por megalina o un fragmento soluble de la misma. Se proporciona una discriminación fiable de la proteína de unión a vitaminas que se une a la vitamina D. Se usan megalina o fragmentos de la misma para discernir el estado de la vitamina D basándose en el complejo endocítico DBP:VD que presentamos, representa la única prohormona bioactivable en la circulación.

La megalina soluble puede producirse en células de mamífero mediante métodos recombinantes y purificarse mediante cromatografía de afinidad. Se prefieren los fragmentos de megalina solubles en disolución acuosa (suero, plasma) ya que permiten condiciones para la formación del complejo DBP:VD cercanas a las fisiológicas.

Tal como se da a conocer, no hay necesidad de liberar vitamina D de sus parejas de unión como en los métodos de la técnica anterior. Por tanto, no hay necesidad de disolventes, tensioactivos y surfactantes halogenados (PFOA, CTAB), lo que hace que el método sea respetuoso con el medio ambiente. La falta de etapas de preparación y purificación preanalítica permite además una determinación directa del estado de vitamina D efectivo inmediatamente después de la obtención de muestras. El concepto de determinar la formación de dicho complejo unido a megalina puede adaptarse fácilmente a plataformas tales como ELISA, turbidimetría y nefelometría. Los componentes proteínicos de dicho complejo pueden cuantificarse de manera fiable.

La presente divulgación está además en conformidad con los informes clínicos de que la 25-hidroxivitamina D₃ es más eficaz que la 25-hidroxivitamina D₂. La divulgación proporciona un estado efectivo basándose en la prohormona endocitable que estará disponible para la activación. Mientras que los isómeros de vitamina 25-hidroxilada D₂ y D₃ se unen por igual a la DBP, el método proporcionado hace uso de la diferente afinidad de unión de la megalina a la DBP cuando interactúa con la 25-hidroxivitamina D₃. La diferente afinidad de unión es sorprendente. Se afirma que se ha descubierto un mecanismo biológico fundamental cuya relevancia fisiológica no puede pasarse por alto. El presente método permite una discriminación de los metabolitos de vitamina D circulatorios activables y, por tanto, proporciona un estado del metabolito de vitamina D fácilmente activable (prohormona). Con la información proporcionada pueden adaptarse las terapias de suplementación con vitamina D al verdadero estado fisiológico del sujeto, evitando toxicidad o terapias ineficaces.

Los principios de la invención se describirán ahora con referencia a sus ventajas, ejemplos representativos y dibujos que, sin embargo, no limitarán la esencia de la invención que puede derivarse de la divulgación contenida en las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos adjuntos,

las figuras 1A-C son representaciones esquemáticas que muestran (A) sitios de unión potenciales de DBP humana (dímero) a megalina según lo predicho por PepSite 2 (Trabuco LG *et al.*, PepSite: prediction of peptide-binding sites from protein surfaces en Nucleic Acids Res. 2012; 40 (edición del servidor web): W423-426); (B) la interacción entre megalina/LRP2, cubilina y sus ligandos conocidos en el exterior de la membrana plasmática luminal; y (C) las rutas de la vitamina D a través de la prohormona (25(OH)D) a la hormona activa (1,25(OH)₂D - calcitriol) así como rutas de excreción;

las figuras 2A-C son representaciones esquemáticas de (A) fragmentos de megalina elegidos sometidos a prueba para determinar la unión de la proteína de unión a vitamina D: Cons M1: M1-K386 (péptido señal + A1-7 + ½ similar a EGF); M2: (péptido señal M1-25 + E1024-K1429); M3: (péptido señal M1-25 + E2698-R3192); M4: (péptido señal M1-25 + P3510-A4048 - sin examen adicional); (B) los constructos de ADNc de fragmentos de megalina (M1, M2 y M3) clonados en el vector de expresión pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA); y (C) inmunotransferencias de tipo

Western de fragmentos de megalina secretados (dímeros M1-M3) y monómero M2: lisados de células HEK y después de la purificación por afinidad Ni-NTA de sobrenadantes de cultivo;

las figuras 3A,B muestran inmunotransferencias de tipo Western de (A) fragmentos de megalina de lisados de células HEK transfectadas (M1, M2, M3 + control/Non; $\sim 20 \mu\text{g}$) y (B) coimmunoprecipitaciones de DBP unida a megalina (M1, M2, M3) ($0,5 \mu\text{g}$) en presencia o ausencia de VD_3 ($0,2 \mu\text{g}$) usando anticuerpo anti-His (tinción WB: Ac anti-DBP);

las figuras 4A,B muestran inmunotransferencias de tipo Western (A) de fragmentos de megalina purificados con Ni-NTA (M1, M2 y M3 + Ac anti-IgG como control; $\sim 3 \mu\text{g}$) y (B) coimmunoprecipitaciones del complejo de DBP unida a megalina ($2 \mu\text{g}$) en presencia o ausencia de VD_3 ($0,5 \mu\text{g}$) usando un anticuerpo anti-His (tinción WB: Ac anti-DBP);

las figuras 5A,B muestran (A) análisis de termoforesis a microescala de fragmentos de megalina M1, M2 y M3 y DBP (50 nM) en presencia o ausencia de VD_3 (50 nM); y (B) el efecto de la concentración de VD_3 en el análisis de afinidad;

las figuras 6A,B muestran inmunotransferencias de tipo Western (A) de DBP coimmunoprecipitada de diferentes sueros o plasmas humanos usando el fragmento M1 de megalina purificado ($3 \mu\text{g}$); y un diagrama de barras (B) que muestra los resultados de un ELISA para la DBP total y la DBP formada/ VD_3 unida por un fragmento de megalina recubierto en la superficie (M1 o M2);

las figuras 7A-C son gráficos (A) que muestran el efecto de DBP purificada añadido en la formación de DBP unida a M2-megalina: $25(\text{OH})\text{D}_3$ en una muestra de suero humano de un sujeto (RMS); y (B) la correlación entre niveles séricos de $25(\text{OH})\text{D}_3$ y la unión de DBP: $25(\text{OH})\text{D}_3$ al fragmento de megalina M2 en suero humano; y (C) la correlación entre el nivel de $25(\text{OH})\text{D}_3$ y el complejo ternario DBP/ $25(\text{OH})\text{D}_3$ /M2 y lo mismo para los complejos ternarios con $25(\text{OH})\text{D}_2$ y $24,25(\text{OH})\text{VD}$, respectivamente;

las figuras 8A,B muestran (A) análisis de termoforesis a microescala de DBP y diversos metabolitos de $25(\text{OH})\text{D}$: ($25(\text{OH})\text{D}_3$, $25(\text{OH})\text{D}_2$, $24,25(\text{OH})\text{D}$); y (B) análisis de termoforesis a microescala de DBP:metabolito de VD cuando se une al fragmento de megalina M2;

las figuras 9A,B son gráficos que muestran el intervalo de linealidad de DBP: $25(\text{OH})\text{D}_3$ unido a megalina y en presencia de concentraciones variables de $24,25(\text{OH})\text{VD}$ y $25(\text{OH})\text{VD}_2$ a altas concentraciones (hasta 50 ng/ml)

las figuras 10A,B son gráficos que muestran el intervalo de linealidad de DBP: $25(\text{OH})\text{D}_3$ unido a megalina y en presencia de concentraciones variables de $24,25(\text{OH})\text{VD}$ y $25(\text{OH})\text{VD}_2$ para concentraciones bajas (hasta 19 ng/ml).

Descripción detallada de la invención

La presente descripción proporciona un método para determinar la cantidad de vitamina D biológicamente eficaz en una muestra de líquido corporal de un sujeto. El método comprende las etapas de poner en contacto dicha muestra con DBP y megalina o un fragmento funcional de la misma en condiciones de unión para formar un complejo DBP:vitamina D (o un metabolito de vitamina D) que se unirá específicamente por la megalina, o un fragmento funcional de la misma, para formar un complejo ternario que comprende DBP:vitamina D:megalina. La cantidad de complejo ternario formado en dicha muestra de líquido corporal puede entonces correlacionarse con la cantidad biológicamente eficaz de vitamina D en dicha muestra de líquido corporal.

En este contexto, el término "vitamina D biológicamente eficaz" o "vitamina D eficaz" define y comprende todas las moléculas estructurales de vitamina D que forman un complejo con DBP que es reconocido y unido por la megalina o un fragmento funcional de la misma para formar un complejo ternario. Esas moléculas estructurales de vitamina D, por tanto, comprenden no sólo vitamina D (cole- y ergocalciferol) sino también los metabolitos de vitamina D 25 -hidroxilados, incluyendo los respectivos epímeros. Durante muchos años, se ha hecho hincapié en medir los niveles totales de 25 -hidroxivitamina D [$25(\text{OH})\text{D}$]. Como los valores medidos no coincidían con las fisiologías, recientemente se planteó la hipótesis de que la " $25(\text{OH})\text{D}$ libre" es potencialmente un mejor marcador del estado de la vitamina D. Sin embargo, la evaluación propuesta de " $25(\text{OH})\text{D}$ libre" se basa en cálculos que usan niveles de $25(\text{OH})\text{D}$ total, albúmina y DBP y en la suposición de una afinidad constante de DBP por los metabolitos de vitamina D. Esta hipótesis funciona con la suposición de que los metabolitos lipófilos de la vitamina D pueden difundirse pasivamente a través de las membranas celulares y que la DBP y la albúmina séricas disminuirían la cantidad fácilmente disponible de vitamina D y el estado de la vitamina D. La determinación de la "fracción libre no unida a DBP de $25(\text{OH})\text{D}$ " dará el "estado actual de vitamina D libre y disponible".

El estado de la vitamina D no sólo es esencial para la función renal normal y la salud ósea, sino que también puede estar relacionado con el desarrollo de cáncer y algunas enfermedades autoinmunitarias. Dado el impacto del estado de la vitamina D en la salud humana, se requieren métodos fiables para la práctica clínica.

La concentración de "25-hidroxivitamina D" total en suero se usa principalmente en la práctica clínica, pero no se puede ignorar la discusión sobre la cantidad o proporción de "25-hidroxivitamina D" "libre o disponible" u oculta. Sin embargo, esta hipótesis no considera que las células epiteliales y las células de otros tejidos (túbulos renales, glándula paratiroidea, placenta, etc.) tienen rutas endocíticas que permiten la internalización endocítica de los metabolitos de vitamina D unidos a DBP. La 25(OH)D es la forma clave de la prohormona para la captación y conversión intracelular a calcitriol. Los metabolitos de vitamina D son principalmente transportados y unidos en la circulación por la proteína de unión a vitamina D. Con los métodos de medición de la técnica anterior, no se conoce la cantidad de metabolitos de vitamina D que pueden activarse e incluso menos conocida es la cantidad de prohormona disponible para la internalización endocítica y la 1 α -hidroxilación a la hormona D activa.

El presente método hace uso de que debe formarse un complejo ternario de vitamina D, DBP y megalina antes de que el metabolito de vitamina D pueda internalizarse por endocitosis, o bien directamente o bien después de la interacción con cubilina (véase la figura 1A-C). Está bien establecido que la vitamina D (colecalfiferol o ergocalciferol) se hidroxila en primer lugar en su posición 25 a la prohormona en el hígado y luego se presenta en la circulación. También estableció bien que la hormona D activa [1,25(OH)₂D] se sintetiza mediante la enzima 1 α -hidroxilasa (Cyp27B1 - citocromo P450) que se encuentra dentro de las células en el exterior de la membrana mitocondrial (véase la figura 1C). El metabolito de vitamina D 25-hidroxilada debe transportarse en primer lugar desde el hígado hasta las células respectivas en el riñón. El riñón es la principal fuente de calcitriol (1,25(OH)₂D), pero también las células extrarrenales, incluyendo los linfocitos, los macrófagos, los queratinocitos y las células de la glándula paratiroidea y el páncreas pueden generar calcitriol.

Se sabe que la 25-hidroxivitamina D₃ es un 300% más eficaz que la 25-hidroxivitamina D₂. De acuerdo con ello, la presente divulgación proporciona una discriminación de la DBP endocitable, digamos que la DBP se ha unido a un metabolito de vitamina D₃. Se usan megalina o fragmentos de la misma para discernir el metabolito de vitamina D₃ fisiológicamente activable. Los fragmentos de megalina recombinantes pueden producirse en líneas celulares de mamíferos y purificarse mediante cromatografía de afinidad. Se proporciona una determinación directa y rápida del estado de vitamina D y no hay necesidad de ningún tratamiento previo adicional o preparación de muestras. La escala de tiempo del ensayo se reduce, por tanto, al tiempo que proporciona lecturas fisiológicas precisas y válidas. El enfoque dado a conocer puede adaptarse fácilmente a diferentes plataformas tales como ELISA, turbidimetría y nefelometría.

El estado de vitamina D novedoso corresponde a la vitamina D fisiológicamente activada y endocitable, en particular, a la 25-hidroxivitamina D₃ en suero o plasma. Las concentraciones de los otros metabolitos de vitamina D endocitables son mucho más bajas. Mientras que los isómeros de vitamina 25-hidroxilada D₂ y D₃ están igualmente unidos por DBP (figura 8A), la mayor afinidad de unión de megalina a DBP:25(OH)VD₃ en comparación con DBP:25(OH)VD₂ y la 24,25-hidroxivitamina D llama la atención. El epímero C3 de la 25-hidroxivitamina D₃ [3-epi-25(OH)D₃] parece desempeñar un papel especial, para el cual existe una falta casi total de datos con respecto a su significado clínico. Aunque se sabe poco acerca de la importancia *in vivo* de 3-epi-25(OH)D₃, los laboratorios clínicos se enfrentan a la decisión de incluir o no 3-epi-25(OH)D₃ en la medición del estado de vitamina D. Los datos en las figuras 8A,B muestran que el método descrito puede detectar y resolver adecuadamente la forma epimérica C-3 de 25(OH)D₃. Por tanto, el presente método permite una distinción para determinar los metabolitos de vitamina D más potentes y, a su vez, proporciona un estado de vitamina D más preciso y fisiológicamente válido que no incluye las formas menos activas. Con la información proporcionada por la presente divulgación, las terapias de suplementación con vitamina D pueden por tanto adaptarse al estado fisiológico del sujeto, evitando toxicidad o terapias ineficientes.

En una realización preferida, el método comprende el uso de un fragmento soluble de megalina y/o una fusión de dicho fragmento de megalina soluble que se une al complejo DBP:metabolito de VD pero ninguno o menos de los otros numerosos ligandos de LPR2/megalina. Más precisamente, un fragmento soluble de megalina que no tiene afinidad por la albúmina o el anticuerpo anti-DBP (¡sin reactividad cruzada de Ac!). Dicha realización puede comprender un fragmento de megalina de unión a DBP unida a la superficie o una proteína de fusión del mismo que contiene un epítipo que comprende:

SEQ ID NO: 01

-D-N-G-N-C-I-H-R-A-W-L-C-D-R-D

o

SEQ ID NO: 2

-G-C-T-H-E-C-V-Q-E-P-F-G-A-K-C-

o ambos epítipos.

La secuencia para la unión por afinidad del complejo DBP:VD humano parece contener

SEQ ID NO: 03
-C-V-Q-E-P-

o

SEQ ID NO: 04
-I-H-R-A-W-

Otros epítomos de unión a DBP útiles dentro de la región de megalina M2 (E1024-K1429) son

SEQ ID NO: 05 (secuencia C19)
-S-D-F-N-G-G-C-T-H-E-C-V-Q-E-P-

SEQ ID NO: 06 (secuencia D5)
-C-Y-N-M-R-G-S-F-R-C-S-C-D-T-G

SEQ ID NO: 07 (secuencia A2)
-F-S-F-P-C-K-N-G-R-C-V-P-N-Y-Y

tal como se determina mediante la interacción de DBP con megalina M2 (E1024-K1429) - SEQ ID NO: 09 - usando la matriz de péptidos CelluSpots™.

Las realizaciones preferidas pueden comprender una determinación del complejo unido a megalina de DBP:metabolitos de VD. Esto puede hacerse usando un anticuerpo que reconozca el complejo DBP:VD o después del aislamiento de DBP, vitamina D o sus metabolitos o megalina o el fragmento soluble de la misma. En un aspecto de la descripción, el método puede comprender proporcionar mezclas de metabolitos de vitamina D y DBP para establecer muestras convencionales.

En una realización preferida, la divulgación puede comprender poner en contacto dicha muestra con una cantidad de DBP añadida para crear condiciones convencionales o un exceso constante de DBP para la unión de la prohormona. La divulgación puede abarcar además el contacto de la muestra con cubilina y/o un fragmento soluble de la misma.

Dicha realización puede comprender un fragmento de megalina de unión a DBP unida a la superficie o una proteína de fusión del mismo que contiene un epítipo que tiene uno o más de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 01 a SEQ ID NO: 10.

En una realización, el método de la divulgación puede referirse a un inmunoensayo turbidimétrico o nefelométrico. Dicha megalina y/o un fragmento soluble de la misma puede unirse a nanopartículas que tienen diámetros que oscilan entre 50 y 200 nm, de modo que el complejo DBP:VD se une a dichas nanopartículas. La divulgación también proporciona un inmunoensayo seleccionado del grupo ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), RIA (radioinmunoensayo), FIA (inmunoensayo de fluorescencia), LIA (inmunoensayo de luminiscencia) o ILMA.

Por consiguiente, el método puede comprender las etapas de (a) proporcionar una cantidad definida de megalina y/o un fragmento soluble de la misma acoplado a una fase sólida; (b) poner en contacto la muestra con la fase sólida que tiene megalina acoplada y/o un fragmento soluble de la misma; (c) crear condiciones para permitir la unión del complejo formado por DBP y el metabolito de vitamina D, en el que DBP sola no se une a megalina y/o a un fragmento soluble de la misma; y lavar la fase sólida; (e) proporcionar un anticuerpo que reconozca el complejo ternario que comprende DBP, vitamina D o su metabolito; (f) poner en contacto dicho complejo ternario con un anticuerpo, opcionalmente un anticuerpo contra DBP, e inmovilizar el inmunocomplejo en la fase sólida; y (g) determinar la cantidad de anticuerpo unido a la fase sólida, y correlacionar la cantidad de anticuerpo unido al estado de vitamina D activable o endocítica en sangre, plasma o suero por referencia con un patrón.

La presente divulgación comprende además un kit de prueba para su uso en un método para medir el estado de vitamina D efectivo que comprende un anticuerpo específico para el complejo ternario, megalina o un fragmento de la misma o DBP, o vitamina D y sus metabolitos. La divulgación también se refiere a un kit de prueba para su uso en un método para medir metabolitos de vitamina D en una muestra de líquido corporal, que comprende nanopartículas que tienen megalina unida y/o fragmentos solubles de la misma.

El objeto logrado es un método simple y fiable para una determinación cuantitativa directa del estado de vitamina D efectivo y sus metabolitos en una muestra. Cuando el líquido corporal es sangre, suero o plasma, el estado describe la fracción endocitable de los metabolitos de vitamina D en la circulación, por ejemplo, la fracción que puede procesarse intracelularmente a la hormona activa por las respectivas células y tejidos diana según sea necesario. El nuevo estado de vitamina D puede determinarse en disolución acuosa a pesar de la naturaleza altamente lipófila de la vitamina D.

La vitamina D₃ se absorbe y procesa fácilmente por el organismo y se considera más potente que la vitamina D₂ que tiene una semivida más corta y se une con menos afinidad al receptor de vitamina D (VDR). 1 α ,25(OH)₂D₃ y la hormona paratiroidea (PTH) influyen en el metabolismo de la vitamina D mediante la regulación positiva o negativa de la actividad de la 1 α -hidroxilasa y la 24-hidroxilasa (véase la figura 1C). Nuevamente, la vitamina D es 25-hidroxilada en el hígado a 25(OH)D₃ o 25(OH)D₂, y posteriormente se hidroxila en células renales a su forma biológicamente activa 1 α ,25(OH)₂D. 24,25(OH)₂D es otro metabolito de 25(OH)D₃, pero inactivo y destinado a la excreción. En la circulación, los metabolitos de vitamina D están estrechamente unidos a la DBP. Cantidades más pequeñas se unen a la albúmina y las lipoproteínas. La afinidad de 25(OH)D ($K_a = 6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) y 1,25(OH)₂D ($K_a = 5,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) por la albúmina es sustancialmente menor que la afinidad por la DBP (25(OH)D ($K_a = 7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) y 1,25(OH)₂D ($K_a = 4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$)). Debido a la abundancia de albúmina en el suero (650 μM) en comparación con DBP (5 μM), es probable que parte de la vitamina D se una a la albúmina, aunque no esté disponible de manera efectiva para la endocitosis. Además, la gran mayoría de la DBP en el suero no está ocupada por ningún metabolito de vitamina D. No ha habido divulgación en la técnica anterior que defina un parámetro que aborde la biodisponibilidad de los metabolitos de vitamina D basándose en su unión a DBP y la siguiente ruta endocítica. Como DBP está presente en altas concentraciones en la circulación, hasta ahora no se ha tenido en cuenta en la evaluación del estado de vitamina D. En la técnica anterior, la vitamina D o bien total (ligada y libre) o bien de circulación libre, por separado, se consideraban fuentes de información para establecer un estado de vitamina D.

La megalina (también conocida como *proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 2*, LRP2) es un receptor celular de unión a múltiples ligandos con similitudes estructurales con el receptor de LDL (LDLR). La megalina puede encontrarse en numerosas células y tejidos, especialmente en la membrana plasmática de las células epiteliales de absorción (Farquhar MG *et al.*, Soc. Nephrol. 6 (1): 35-47). Se sabe que LRP2/megalina media en la endocitosis de sus ligandos y puede formar complejos con cubilina en los que los complejos cubilina:megalina pueden (re)absorber moléculas nuevamente. El complejo cubilina:megalina es, entre otros, responsable de la captación celular de lípidos, VLDL, determinadas proteínas (albúmina, lactoferrina), cobalamina (vitamina B₁₂) y calcidiol. La presente divulgación propone determinar la cantidad de DBP:VD que está unida por la megalina. Esto puede hacerse, por ejemplo, mediante un ELISA contra DBP humana después del "aislamiento o separación" de dicho complejo ternario. Esto es lo preferido y el ELISA ya está disponible comercialmente (Immundiagnostik AG, Bensheim). El término "vitamina D eficaz" describe un complejo formado de DBP:VD que se ha unido a megalina (o un fragmento de la misma). Se considera que el complejo con megalina interactúa con cubilina de modo que el "metabolito de vitamina D activado" se someterá a endocitosis y posteriormente se hidroxilará en 1 α para convertirse en la hormona activa.

El estado de vitamina D efectivo representa una mejora con respecto al estado de la técnica, ya que ofrece información fisiológica y una lectura de la concentración de vitamina D circulante que se procesará a la hormona D. Este estado es diferente a la principal forma de almacenamiento circulante porque las formas menos activas tales como 25(OH)D₂ no contribuirán, o mucho menos, al estado de vitamina D efectivo. La presente divulgación proporciona un estado de vitamina D basándose en la cantidad de DBP:VD, unida selectiva y discriminablemente por la megalina y/o cubilina. Este complejo endocítico corresponde, por tanto, al estado de vitamina D efectivo en suero o plasma. Sin embargo, el término "biodisponible" tal como se usa en la técnica anterior se refiere a la vitamina D "totalmente libre" que es especulativa y se basa en una supuesta difusión a través de la membrana plasmática de las células.

Hay puntos de vista contradictorios en la técnica anterior con respecto al papel de DBP. Por un lado, la unión de la vitamina D a la DBP se ha considerado un mecanismo de protección frente a cantidades excesivas de la vitamina libre. Este punto de vista es seguido por grupos que apoyan la "hipótesis de la hormona libre". Por otro lado, estudios en ratones con DBP inactivada mostraron que estos animales tienen niveles plasmáticos significativamente reducidos de 25(OH)D₃ y 1,25-(OH)₂D₃. Con una dieta empobrecida en vitamina D, los animales padecieron deficiencia de vitamina D y defectos en la formación ósea. Estos resultados apuntan al desarrollo de rutas alternativas que no serán relevantes cuando DBP esté presente en la circulación.

Las hormonas esteroideas y los esteroides, tales como la vitamina D, son lipófilos y, por lo general, requieren una proteína transportadora para una administración eficaz. Hay muchos portadores séricos específicos de ligandos de hormonas esteroideas y esteroides, incluyendo la globulina de unión a corticosteroides (CBG) (glucocorticoides, mineralocorticoides), proteína de unión a vitamina A (retinol), proteína de unión a vitamina D (DBP), globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG) (estrógenos, andrógenos) y globulina de unión a hormona tiroidea. Por ejemplo, CBG y SHBG no solo actúan como transportadores de suero de alta afinidad, sino que también se unen a las membranas celulares en sus formas de ligando, lo que sugiere acciones alternativas como transductores de señales. De manera similar, DBP es un factor activador de macrófagos (MAF) y una proteína fijadora de actina, cuyas funciones parecen independientes de la unión a los metabolitos de vitamina D. Los mecanismos por los cuales los ligandos se liberan de las globulinas de unión y son adquiridos por las células diana son cruciales para las rutas de señalización de las hormonas esteroideas.

Esto es particularmente importante para la vitamina D, donde cada vez hay más pruebas de conversión intracrina extrarrenal de la prohormona (25(OH)D) en hormona D activa. El impacto de la vitamina D depende entonces en gran medida de la expresión específica de tejido de la 1 α -hidroxilasa y el receptor de 1,25(OH)₂D, el receptor

nuclear de vitamina D (VDR). Se ha estimado que las concentraciones de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ libre en suero son de aproximadamente 10^{-13} M, que es mucho menor que las concentraciones indicadas para la unión al receptor de vitamina D (constante de disociación (K_d) = aproximadamente 10^{-10} M). Debido a la disparidad obvia entre las cantidades de hormona libre disponibles para (supuestamente) la difusión pasiva y los niveles requeridos para ocupar de manera eficiente los receptores diana intracelulares, la "hipótesis de la hormona libre" genera dudas como base para estado de vitamina D fisiológicamente relevante ("verdadero").

La $25(\text{OH})\text{D}$ total se mide actualmente mediante CL-EM/EM (Instituto de Estándares y Tecnología y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades). Se usan diversos inmunoensayos para determinar las concentraciones de $25(\text{OH})\text{D}$ total y otros metabolitos de vitamina D. Sin embargo, todos estos métodos producen resultados muy variables, probablemente debido a la necesidad de liberar los metabolitos de vitamina D de sus proteínas transportadoras. Esto implica un riesgo de pérdida de vitamina D a través de la unión a las superficies de los vasos sanguíneos, de modo que se determina un nivel de vitamina D falso (bajo). Los estudios de cromatografía de afinidad que usan DBP inmovilizada y membranas de riñón de conejo solubilizadas han identificado los correceptores para la captación del complejo $25(\text{OH})\text{D}_3$ -DBP en los túbulos renales, a saber, una proteína de 600 kDa (megalina) y una proteína de 460 kDa (cubilina). Estos estudios muestran una unión dependiente de Ca^{2+} de DBP a cubilina. Los autores no sugieren que la unión de DBP a cualquiera de los correceptores esté precedida, influenciada o dependa de un complejo formado de DBP y $25(\text{OH})\text{D}_3$, ni en el tipo de metabolito de vitamina D unido por DBP (Nykjaer *et al.*, Cubilin dysfunction causes abnormal metabolism of the steroid hormone $25(\text{OH})$ vitamin D_3 , Proc Natl Acad Sci U S A. 20 de noviembre de 2001; 98(24): 13895-13900).

La megalina tiene tres dominios: un dominio amino-terminal extracelular de 4400 aminoácidos, un dominio transmembrana de 22 aminoácidos y una cola citoplasmática carboxi-terminal de 213 aminoácidos, lo que indica que es un receptor de superficie celular de tipo I. El dominio extracelular contiene cuatro grupos ricos en cisteína de repeticiones LDLR tipo A (tipo complemento). La repetición de tipo complemento consiste en aproximadamente 40 aminoácidos que contienen seis residuos de cisteína y el motivo SDE (Ser-Asp-Glu) responsable de la unión de alta afinidad de secuencias cargadas positivamente en ligandos para LDLR. Los cuatro grupos ricos en cisteína están flanqueados por repeticiones tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) y regiones espaciadoras que contienen motivos YWTD (Tyr-Trp-Thr-Asp) que son responsables de la disociación de ligandos dependiente del pH en los compartimentos endosómicos. El dominio citoplasmático de megalina contiene tres motivos NPXY de tetraaminoácidos, que son esenciales para la endocitosis del complejo ligando-receptor a través de pozos recubiertos de clatrina.

La megalina tiene diversos tipos de ligandos: proteínas de unión a vitaminas y otras proteínas de unión, apolipoproteínas, hormonas y precursores de hormonas, fármacos y toxinas, enzimas e inhibidores de enzimas, proteínas relacionadas con la respuesta inmunitaria y el estrés, y otros, incluyendo el calcio. Los ratones con megalina inactivada no pueden recuperar la DBP del filtrado glomerular y la pierden junto con su carga de vitamina D en la orina. Como consecuencia, los ratones con megalina inactivada no pueden metabolizar adecuadamente la $25(\text{OH})\text{D}$ a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ resultando en un fenotipo óseo que se asemeja al raquitismo por deficiencia de vitamina D.

La cubilina se ha identificado como un receptor del complejo del factor intrínseco B12 (IF-B) en el íleon terminal. Es un receptor de 460 kDa sin dominio transmembrana y sin señales de endocitosis. La cubilina contiene 27 dominios CUB responsables de la unión del ligando y ocho repeticiones de tipo EGF precedidas por un tramo de 110 aminoácidos, donde la región N-terminal parece esencial para el anclaje a la membrana. Se ha demostrado una asociación directa entre cubilina y megalina, por lo que la cooperación molecular proporciona la base para la internalización de ligandos unidos a cubilina. Por tanto, los ligandos de unión a cubilina pueden sufrir endocitosis mediada por megalina, descargar su carga en los lisosomas y recircularse de nuevo a la membrana plasmática junto con megalina.

Aunque la captación de DBP dependiente de megalina tiene un papel claro en la endocrinología renal de la vitamina D, aún no está claro si un mecanismo similar está presente en otros tejidos diana de la vitamina D. Fuera del riñón, la megalina se expresa en varios tejidos, incluyendo la placenta, la glándula mamaria y las glándulas paratiroides, que se sabe que tienen actividad 1 α -hidroxilasa, lo que sugiere una interacción extrarrenal DBP-megalina.

La presente divulgación describe un método para determinar el estado de la vitamina D basándose en la detección y cuantificación de un complejo que comprende DBP, vitamina D y o bien una de megalina y cubilina o bien ambas. A diferencia de la técnica anterior, el presente método no requiere una liberación específica de los metabolitos de vitamina D de DBP y sólo se evaluará la fracción de metabolitos de vitamina D que está sujeta a endocitosis y activación. Sin desear limitarse a ninguna teoría, la medición de la DBP unida a megalina proporciona un parámetro para los metabolitos de vitamina D endocitables. Por tanto, el método proporcionado puede usarse para establecer un estado de vitamina D que corresponde a la concentración de vitamina D fisiológicamente activa y endocitable en suero o plasma.

Con el presente método, los diversos metabolitos de vitamina D, en particular la $25(\text{OH})\text{D}_3$ pueden discriminarse, así como los cambios en las concentraciones séricas totales de 25OHD , $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ y DBP en sujetos después de la suplementación con colecalciferol (vitamina D_3) o ergocalciferol (vitamina D_2). La suplementación ya no interferirá

con la medición de las moléculas activas de vitamina D que estarán sujetas a endocitosis e hidroxilación. Por tanto, la fracción de moléculas de vitamina D verdaderamente biodisponibles puede discernirse fácilmente de la vitamina D₂ suplementada o moléculas de vitamina D unidas por otras proteínas en la circulación.

Puede usarse inmunonefelometría para medir la concentración de DBP en una muestra. La inmunonefelometría cuantifica la dispersión de una fuente de luz incidente por grandes complejos antígeno-anticuerpo solubles en condiciones de un exceso moderado de anticuerpos. En estas condiciones, los complejos forman una red cristalina estable y se establece una relación lineal directa entre una concentración creciente de antígeno y el aumento de la intensidad de la luz dispersada. Los nefelómetros automatizados proporcionan mediciones sensibles y precisas de la concentración de DBP de manera rápida y con requisitos mínimos de habilidad técnica. Estos pueden usarse en laboratorios de química clínica para analizar las concentraciones de DBP. En una realización preferida, el anticuerpo sólo reconoce el complejo ternario formado por DBP, vitamina D y megalina.

En otro aspecto, la inmunoturbidimetría puede usarse para medir la concentración de DBP en una muestra. La turbidimetría es el proceso de medir la pérdida de intensidad de la luz transmitida debido al efecto de dispersión de las partículas suspendidas en ella. La luz pasa a través de un filtro creando una luz de longitud de onda conocida que luego pasa, por ejemplo, a través de una cubeta que contiene una disolución. Una célula fotoeléctrica recoge la luz que pasa a través de la cubeta. Luego se da una medida de la cantidad de luz absorbida. La inmunoturbidimetría es una variante en la que tiene lugar una reacción antígeno-anticuerpo. Los complejos antígeno-anticuerpo son partículas que pueden detectarse ópticamente con un fotómetro. En una realización preferida, el anticuerpo reconoce un complejo ternario formado por DBP, vitamina D y megalina. En otro aspecto, las nanopartículas recubiertas con megalina o fragmentos de la misma se ponen en contacto con una muestra que contiene complejos de DBP/vitamina D. Las concentraciones crecientes de complejo ternario de DBP/vitamina D/megalina en la muestra dan como resultado una mayor turbidez.

Ejemplos

EJEMPLO 1

Las funciones biológicas complejas emergen a través de intrincadas redes de interacción proteína-proteína. Una clase importante de interacción proteína-proteína corresponde a las interacciones mediadas por péptidos, en las que un tramo corto de péptido de una pareja interactúa con una gran superficie de proteína del otro compañero. Las interacciones proteína-péptido son normalmente de baja afinidad y están involucradas en mecanismos reguladores, remodelando dinámicamente las redes de interacción de proteínas. Debido a la superficie de interacción relativamente pequeña, la modulación de las interacciones proteína-péptido se ha considerado factible y muy atractiva, por ejemplo, con fines terapéuticos. Desafortunadamente, el número de estructuras 3D disponibles de superficies de contacto proteína-péptido es muy limitado. Sin embargo, hubo información limitada o nula con respecto a la interacción de DBP con otras proteínas, en particular, megalina/LRP2 (UniProtKB/Swiss-Prot, número de registro de proteína P98164, humana) en el contexto del transporte y metabolismo de la vitamina D. Con el fin de examinar la interacción potencial de DBP con megalina a nivel de péptido, el programa PepSite2 (<http://pepsite2.russelllab.org>) se usó para predecir puntos de unión a péptidos. El método PepSite se basa en entornos de unión de péptidos preferidos calculados a partir de un conjunto de estructuras 3D de proteínas y péptidos conocidas, combinados con restricciones de distancia derivadas de péptidos conocidos. Según la predicción de PepSite, es probable que la megalina interactúe con la proteína de unión a vitamina D humana a través de las repeticiones de unión al ligando 9, 13-15, 16, 19, 22-25; 27 y 29 ubicados en los dominios 2 y 3 (véanse las figuras 1A).

De acuerdo con la predicción anterior, los presentes inventores seleccionaron repeticiones de unión a ligandos de tipo complemento ricas en cisteína (LDLR clase A) para el análisis de la interacción DBP-megalina. También se incluyeron módulos similares a EGF, ya que se consideran importantes para el plegamiento de receptores y la disociación de ligandos en el compartimento endosómico. Se introdujo un péptido señal (M1-G25) en los extremos N-terminales de las repeticiones de tipo complemento para permitir la clasificación en la ruta secretora. Se añadió una etiqueta 6xHis C-terminal para la purificación por afinidad y el análisis de proteínas mediante coimmunoprecipitación e inmunotransferencia de tipo Western. Las secuencias de ADNc respectivas se obtuvieron mediante PCR y se insertaron en el vector de expresión de mamíferos pcDNA3.1. Dado que se requiere calcio para un plegamiento correcto del dominio LDLR-A, las células HEK se transfectaron de manera estable con secuencias de ADNc de megalina (M1, M2, M3) ya que tienen canales de calcio endógenos. La purificación de proteínas se realizó usando la etiqueta His y una resina Ni-NTA disponible comercialmente. La estrategia de clonación de fragmentos de megalina (M1, M2, M3) en el vector de expresión de mamíferos pcDNA3.1 se muestra en las figuras 2A-B.

El ADNc de megalina M1 codificó la secuencia de aminoácidos 26 a 386 de LRP2/megalina humana (SEQ ID NO: 08). El constructo incluía ADNc que codificaba para un péptido señal de 25 aminoácidos N-terminal y una etiqueta de histidina 6x C-terminal. El peso molecular previsto fue de aproximadamente 43 kDa para el monómero y de aproximadamente 86 kDa para el dímero.

El fragmento de megalina M1 recombinante secretado y expresado por HEK tenía la siguiente secuencia de aminoácidos (sin secuencias señal):

SEQ ID NO: 08

5 IPADWRCDGT KDCSDDADEI GCAVVTCCQG YFKCQSEGC IPNSWVCDQD
QDCDDGSDER QDCSQSTCSS HQITCSNGQC IPSEYRCDHV RDCPDGADEN
DCQYPTCEQL TCDNGACYNT SQKCDWKVDC RDSSDEINCT EICLNHEFSC GNGECIPRAY
VCDHDNDCQD GSDEHACNYP TCGGYQFTCP SGRCIYQNWV CDGEDDCKDN
GDEDGCESGP HDVHKCSPRE WSCPESGRCI SIYKVC DGIL DCPGREDENN TSTGKYCSMT
LCSALNCQYQ CHETPYGGAC FCPPGYIINH NDSRTCVEFD DCQIWGICDQ KCESRPGRHL
CHCEEGYILE RGQYCK

El ADNc de megalina M2 codificó la secuencia de aminoácidos 1024-1429 de LRP2/megalina humana (SEQ ID NO: 09). El constructo incluía ADNc que codificaba para un péptido señal de 25 aminoácidos N-terminal y una etiqueta de histidina (6x) C-terminal. El peso molecular previsto fue de aproximadamente 50 kDa para el monómero y de aproximadamente 100 kDa para el dímero. El fragmento megalina M2 de la proteína recombinante secretada y expresada por HEK tenía la siguiente secuencia de aminoácidos (sin secuencias señal):

SEQ ID NO: 09

15 EQCGLFS FPCKNGRCVP NYLDCGVDD CHDNSDEQLC GTLNNTCSSS AFTCGHGECI
PAHWRCDKRN DCVDGSDEHN CPTHAPASCL DTQYTCDNHQ CISKNWVCDT
DNDCGDGSDE KNCNSTETCQ PSQFNCPNHR CIDLSFVCDG DKDCVDGSDE
VGCVLNCTAS QFKCASGDKC IGVNTRCDGV FDCSDNSDEA GCPTRPPGMC
HSDEFQCQED GICIPNFWEC DGHPDCLYGS DEHNACVPKT CPSSYFHCDN
GNCIHRAWLC DRDNDGCDMS DEKDCPTQPF RCPSWQWQCL GHNICVNLSV
VCDGIFDCPN GTDESPLCNG NSCSDFNNGC THECVQEPFG AKCLCPLGFL LANDSKTCED
IDECILGSC SQHCYNMRGS FRCSCDTGYM LESDGRCTCK

El ADNc de megalina M3 codificó la secuencia de aminoácidos 2698 a 3192 de LRP2/megalina humana (SEQ ID NO: 10). El ADNc codificaba para un péptido señal de 25 aminoácidos y una etiqueta de histidina 6x C-terminal. El peso molecular predicho fue de aproximadamente 60 kDa para el monómero y 120 kDa para el dímero. La construcción se expresó en células de mamífero HEK 293. El fragmento de megalina M3 secretado. SEQ ID NO:10 corresponde a la siguiente secuencia de aminoácidos (sin secuencias señal):

SEQ ID NO: 10 ERC GASSFTCSNG RCISEEWKCD
NDNDCGDGSD EMESVCALHT CSPTAFTCAN GRCVQYSYRC DYYNDCGDGS
DEAGCLFRDC NATTEFMCNN RRCIPREFIC NGVDNCHDNN TSDEKNCPDR
TCQSGYTKCH NSNICIPRVY LCDGDNDCGD NSDENPTYCT
THTCSSSEFQ CASGRICIPH WYCDQETDCF DASDEPASC HSERTCLADE FKCDGGRCIP

SEWICDGDND CGDMSDEDKR HQCQNQNCSD SEFLCVNDRP PDRRCIPQSW
VCDGDVDCTD GYDENQNCTR RTCSENEFTC GYGLCIPKIF RCDRHNDGCG YSDERGCLYQ
TCQQNQFTCQ NGRCISKTFV CDEDNDGCGD SDELMHLCHT PEPTCPPHEF KCDNGRCIEM
MKLCNHLDDC LDNSDEKGC INECHDPSIS GCDHNCTDTL TSFYCSCRPG YKLMSDKRKC
VDIDECTEMP FVCSQKCEV IGSYICKCAP GYLREPDGKT CR

El análisis de proteínas de los fragmentos de megalina M1, M2, M3 se realizó mediante inmunotransferencia de tipo Western empleando un anticuerpo contra etiqueta 6x His. Las células transfectadas con los constructos anteriores (M1, M2, M3) se lisaron y el lisado se analizó en busca de proteínas con una etiqueta His. Los fragmentos de megalina también se purificaron a partir de los sobrenadantes celulares usando la resina Ni/NTA, que se une a las proteínas con una etiqueta His (derecha). Los resultados se muestran en la figura 2C.

Las inmunotransferencias de tipo Western muestran que las células HEK expresaron y secretaron fragmentos de megalina M1, M2, M3. Los fragmentos de megalina podían mantenerse en disolución. No se observó precipitación. Los fragmentos de megalina mostraron una tendencia a formar dímeros pero los pesos moleculares coincidieron con los tamaños predichos. Se usaron tampones de muestra 2X Laemmli y 2X Urea para el análisis de la formación de monómeros y dímeros de megalina, pero no se observaron diferencias con el uso de estos tampones. El fragmento M2 fue el que pudo disociarse más fácilmente al monómero.

Los fragmentos de megalina se examinaron más a fondo para determinar su interacción con DBP en presencia (+) o ausencia (-) de vitamina D₃ (VD₃). Se realizaron coimmunoprecipitaciones y los resultados se muestran en las figuras 3 A, B. En resumen, las células HEK se transfectaron con los constructos de ADNc anteriores (M1, M2, M3) y los lisados celulares se usaron para la coimmunoprecipitación. La figura 3A muestra una inmunotransferencia de tipo Western de lisados celulares (20 µg) de células HEK que expresan M1, M2 y M3. Detección con un anticuerpo contra etiqueta His. La figura 3B muestra los resultados de una coimmunoprecipitación con DBP (0,5 µg y VD₃ (0,2 µg).

Las muestras de suero incluían DBP sola o en presencia de vitamina D₃ añadida. Cada muestra se puso en contacto con un lisado celular que contenía un fragmento de megalina. Después de la incubación, las muestras se pusieron en contacto con perlas recubiertas con un anticuerpo contra etiqueta His y la DBP se redujo mediante centrifugación. Los ligandos unidos (DBP) se disociaron de las perlas y se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western para determinar la expresión de DBP usando un anticuerpo anti-DBP. Como control, se analizó DBP pura sola. La figura 3B confirma que la DBP podía reducirse con fragmentos de megalina M1 y M2. En particular, la DBP sola podía reducirse en presencia (+) de vitamina D₃. Esto indica que los fragmentos de megalina M1 y M2 no interactúan con la DBP sola, sino sólo cuando la DBP está ocupada por un metabolito de vitamina D. En otras palabras, se formó un complejo ternario que comprende la proteína de unión a vitamina D, el metabolito de vitamina D y el fragmento de megalina *in vitro*, y no tuvo lugar interacción entre los fragmentos de megalina M1 o M2 y DBP sola.

Coinmunoprecipitaciones adicionales muestran la interacción *in vitro* entre DBP y fragmentos de megalina M1, M2, M3 solubles purificados con agarosa Ni-NTA (3 µg) en una configuración similar a la anterior. Los resultados se muestran en las figuras 4 A, B. La figura 4A es una inmunotransferencia de tipo Western de fragmentos de megalina M1, M2, M3 purificados de sobrenadantes de cultivo (3 µg), secretados por células HEK transfectadas con ADNc para fragmentos de megalina M1, M2 y M3; detección por anticuerpos anti-His. La figura 4 B muestra una inmunotransferencia de tipo Western con los resultados de una coimmunoprecipitación con fragmentos de megalina M1, M2, M3 purificados. Las muestras de suero contenían DBP sola o en presencia (+) de vitamina D₃. Después de la incubación, las muestras se pusieron en contacto con perlas recubiertas con un anticuerpo contra etiqueta 6xHis y se centrifugaron. Las proteínas unidas se disociaron de las perlas y se analizaron mediante inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo contra la proteína de unión a vitamina D. De nuevo, la figura 4B confirma que la DBP podía reducirse con fragmentos M1 y M2 solubles purificados. La DBP se redujo solo en presencia (+) de vitamina D₃. Esto indica que los fragmentos solubles purificados de megalina M1 y M2 no interactúan con DBP a menos que estén ocupados con vitamina D₃. Se formaron complejos ternarios que comprenden DBP, vitamina D₃ y fragmentos de megalina M1 o M2 purificados *in vitro*. No se observó interacción ni unión entre los fragmentos M1 o M2 de megalina purificados solubles y DBP sola.

EJEMPLO 2

Para una mayor caracterización del complejo formado de fragmentos de megalina M1 o M2 solubles purificados y DBP solas u ocupados por el metabolito de vitamina D, los complejos obtenidos se analizaron más a fondo mediante termoforesis a microescala y los resultados se muestran en la figura 5A. La termoforesis a microescala (MST) examina el movimiento dirigido de partículas en un gradiente de temperatura microscópico (termoforesis). Cualquier cambio en la cubierta de hidratación de las biomoléculas debido a cambios en su conformación da como resultado un cambio relativo del movimiento a lo largo del gradiente de temperatura. Este principio puede usarse para determinar la afinidad de unión de dos moléculas. Esta técnica permite en particular un examen de las interacciones en disolución sin ninguna inmovilización sobre una superficie. Una diferencia de temperatura espacial conduce a un agotamiento de la concentración de moléculas en la región de temperatura elevada, que luego puede determinarse. La termoforesis generalmente se realiza con moléculas marcadas con fluorescencia.

La diferencia en la termoforesis de la molécula puede usarse además para cuantificar la fuerza de unión en condiciones de tampón constantes. El movimiento termoforético de la molécula marcada con fluorescencia se mide monitorizando la distribución de fluorescencia dentro de un capilar. El gradiente de temperatura microscópico es generado por un láser IR, que se enfoca en el capilar y se absorbe en el agua. Por tanto, aumenta la temperatura de la disolución acuosa en la región del punto láser. Se observa una distribución de fluorescencia homogénea dentro del capilar antes de encender el láser IR. Cuando se enciende el láser IR, se establece una nueva distribución de fluorescencia. El tiempo de relajación térmica es rápido e induce una caída dependiente de la unión en la fluorescencia del colorante debido a su respuesta local dependiente del medio ambiente al aumento de la etapa de temperatura. Las moléculas se mueven entonces desde la región calentada localmente hacia las regiones frías exteriores. La concentración local de moléculas disminuye en la región calentada hasta que alcanza una distribución de estado estacionario.

La fluorescencia normalizada (Fnorm) mide una proporción de concentración, teniendo en cuenta el aumento de la etapa de temperatura. Debido a la linealidad de la intensidad de la fluorescencia y el agotamiento termoforético, la fluorescencia normalizada de la molécula no unida y el complejo unido se superponen linealmente. Los parámetros de unión cuantitativos se obtuvieron usando diluciones en serie del sustrato de unión. Al representar gráficamente

Fnorm contra el logaritmo de las diferentes concentraciones de la serie de dilución, se obtiene una curva de unión sigmoidea. Esta curva de unión puede ajustarse directamente con la disolución no lineal de la ley de acción de masas, con la constante de disociación K_d como resultado.

En resumen, la DBP purificada se marcó con el colorante fluorescente rojo NT-647 usando rojo de kit de marcaje de proteínas Monolith (NanoTemper Technologies, Múnich, Alemania). Se titularon fragmentos de megalina solubles purificados con Ni-NTA M1, M2 y M3 en el intervalo de desde 0,488 hasta 1000 nmol/l. Para las mediciones se usó un dispositivo Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies) y el software NT Analysis versión 1.427 (NanoTemper Technologies).

Se realizó análisis termoforético a microescala de la unión entre los fragmentos M1, M2 y M3 de megalina solubles purificados con etiqueta His y DBP en ausencia o en presencia de vitamina D_3 . Los resultados se muestran en la figura 5A. De acuerdo con los experimentos de coinmunoprecipitación anteriores, los fragmentos M1 y M2 interactuaron con DBP pero M3 no. Se calcularon las constantes de disociación para cada experimento. Ambos fragmentos de megalina M1 y M2 mostraron una unión débil a DBP en ausencia de 25-OH vitamina D_3 (M1/DBP: $K_d = 442 \pm 44,93$ nM; M2/DBP: $134,2 \pm 23,57$ nM)). Por el contrario, se encontró una alta afinidad de unión para ambos fragmentos de megalina en presencia de 25(OH) D_3 ya que la constante de disociación K_d fue notablemente más baja (M1/DBP/VD $_3$: $K_d = 45,65 \pm 4,57$ nM; M2/DBP/VD $_3$: $23,7 \pm 2,28$ nM). También observamos un aumento de la unión de DBP a fragmentos de megalina solubles purificados M1 o M2 en presencia de 25(OH) D_3 .

El resultado es una buena evidencia de una DBP de unión dependiente a 25(OH) D_3 a megalina. El fragmento de megalina M2 tenía una mayor afinidad por el complejo DBP: 25(OH) D_3 y se usó por tanto en estudios posteriores.

El impacto de la concentración de 25(OH) D_3 en la unión de los fragmentos M1 y M2 de megalina solubles a DBP se evaluó adicionalmente usando un ELISA que ya representa una realización del nuevo ensayo de unión al complejo propuesto para el estado de vitamina D efectivo. Los resultados se muestran en la figura 5B. En resumen, una placa de microtitulación se recubrió con fragmento M1 o M2 de megalina soluble purificado (1 μ g/100 μ l de PBS). Se prepararon mezclas de DBP y 25(OH) D_3 usando 1 μ g de DBP y diluciones seriadas de 25(OH) D_3 (VD $_3$) en PBS (0, 0,3125, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 μ g). Cada mezcla se aplicó a los pocillos recubiertos, se incubó en condiciones fisiológicas para permitir la formación de un complejo ternario y se lavó. La detección y cuantificación de DBP unida por megalina (fragmentos solubles M1 y M2) se llevó a cabo usando un anticuerpo policlonal de conejo contra DBP y anticuerpo de burro anti-IgG de conejo conjugado con HRP. La absorbancia se leyó a 450 nm.

Tal como se muestra en la figura 5B, la unión de los fragmentos solubles de megalina M1 y M2 a DBP dependía de la 25-hidroxi-vitamina D_3 . Más precisamente, la absorbancia es lineal proporcional a la concentración de vitamina D_3 tal como se muestra en la figura 9A y la figura 10A y esta relación no se ve afectada por concentraciones crecientes de 25(OH)VD $_3$ o 24,25(OH)VD $_3$ (véase la figura 9B, 10B). Es importante destacar que estos experimentos demuestran una prueba de principio para mediciones de vitamina D fáciles y fiables basadas en el complejo ternario.

EJEMPLO 3

Se analizaron las propiedades de unión de los diversos fragmentos solubles en megalina adicionalmente mediante coinmunoprecipitación usando muestras de suero y plasma de sujetos humanos. Los resultados se muestran en la figura 6A. La proteína megalina M1 soluble purificada se mezcló con dos muestras de suero o plasma humano para permitir la interacción entre el fragmento de megalina M1 soluble y la DBP endógena presente en la muestra. Las muestras se incubaron con resina Ni-NTA para permitir la interacción de megalina M1/DBP con la resina. Después de lavar la resina, el complejo unido se eluyó de la resina y se analizó mediante inmunotransferencia de tipo Western. La figura 6A (derecha) muestra que DBP estaba presente en ambas muestras y podía detectarse usando un anticuerpo específico. La figura 6A (izquierda, transferencia superior) muestra que el fragmento M1 de megalina soluble purificado interactuó en disolución con DBP en todas las muestras, tal como se demuestra mediante la presencia de DBP extraído. Cabe destacar que al usar una muestra de control que contenía sólo suero pero no proteína megalina, no se detectó DBP. La presencia de proteína megalina M1 purificada se detectó en todas las muestras usando un anticuerpo anti-etiqueta 6xHis (figura 6A, izquierda, transferencia inferior).

En resumen, las coinmunoprecipitaciones son prueba de que el complejo de DBP y 25(OH) D_3 puede unirse y aislarse específicamente a partir de plasma o suero usando un fragmento de megalina soluble adecuado. Se ha demostrado que la porción de megalina con los aminoácidos 26-386 y 1024-1429 está involucrada en la formación de un complejo ternario con DBP y 25(OH) D_3 . La región megalina externa con los aminoácidos 2698-R3192 no participó en la unión en las condiciones descritas.

La presente solicitud comprende secuencias de aminoácidos representativas de megalina que pueden usarse en la unión de DBP. Estas pueden usarse además para determinar el estado de vitamina D endocítica o activable en líquidos corporales. El estado de vitamina D endocitable prevalece sobre cualquier estado de "vitamina D libre" o "vitamina D total" ya que no habrá necesidad de distinguir entre "libre" o "total" del "estado fisiológico de vitamina D disponible para endocitosis y 1 α -hidroxilación". Los métodos convencionales generalmente no determinan el estado de vitamina D fisiológicamente relevante, ya que no pueden analizar los metabolitos listos para el procesamiento a la

hormona activa. Por tanto, los métodos convencionales son insuficientes mientras que el presente método se refiere al estado de la prohormona circulante que puede y será hidroxilada en el riñón, y probablemente en otros tejidos, dando lugar a la hormona activa.

5 EJEMPLO 4

Para una caracterización detallada de la proporción del complejo ternario de DBP, vitamina D₃ y megalina (fragmentos M1 y M2) se desarrolló un ELISA usando placas recubiertas de megalina. La cantidad total de DBP en la muestra de suero se determinó usando un ELISA comercial para DBP. Los resultados se muestran en la figura 6B. El ensayo muestra que sólo una pequeña proporción (0,0028%) de la cantidad total de DBP en el suero se ha unido a la vitamina D₃ hidroxilada y puede unirse por la megalina. Usando el fragmento de megalina M1, el ensayo arrojó un valor de concentración de 9,45 ng de complejo/ml de suero. En el caso del fragmento de megalina M2, se obtuvo un valor de aproximadamente 12,89 ng de complejo/ml de suero. Esta es una evidencia de que el fragmento de megalina sólo formó DBP cuando estaba en un complejo con la prohormona. Por tanto, la megalina puede considerarse un medio para la detección y cuantificación de la prohormona activada fisiológicamente (unida a DBP) en una muestra clínica.

Se observó que a veces era necesario añadir una cantidad de DBP purificada (DBP, de desde aproximadamente 5 hasta 25 ng/ml) para inducir un complejo ternario entre megalina, DBP y el metabolito de vitamina D en el suero humano. Con el fin de evaluar el efecto de DBP añadida en la formación del complejo ternario, también se realizó ELISA con cantidades crecientes de proteína de unión a vitamina D purificada. Los resultados se muestran en la figura 7A. En la muestra de suero (RMS), la adición de DBP purificada en un intervalo de dosis de hasta 25 ng/ml no afectó la unión del complejo DBP/VD₃ al fragmento de megalina M2 soluble purificado. El valor inicial de 8,65 ng/ml se mantuvo sin cambios independientemente de la DBP purificada añadida. Se observó un ligero aumento en la interacción complejo-megalina al añadir altas cantidades de DBP purificada hasta 40 ng/ml. Por encima de este límite, el complejo ternario se formó exponencialmente. Dentro de los límites, los niveles medidos del complejo ternario de DBP-VD₃-megalina, por tanto, no dependen de la cantidad de proteína de unión a vitamina D purificada añadida.

A modo de comparación, se analizaron cinco muestras de suero (S3, S6, S8, S9, RMS) de diferentes sujetos para determinar la concentración de DBP total (DBP), 25(OH)D₃ y complejo ternario de DBP:25(OH)VD:M2. La DBP se determinó mediante ELISA. El contenido de 25(OH)D₃ se cuantificó convencionalmente por un laboratorio independiente. El complejo ternario DBP:25(OH)VD: megalina M2 se analizó mediante un ELISA de DBP:VD₃:megalina según la divulgación. La tabla 1 a continuación resume los resultados para la comparación.

TABLA 1

Muestra de suero	DBP total (µg/ml)	25(OH)VD ₃ (nmol/l) / (ng/ml)		DBP:25(OH)VD:M2 (ng/ml)
S3	576,7 ± 69,8	92	36,86	15,9 ± 2,4
S6	208,1 ± 36,7	21	8,4	7,8 ± 1,1
S8	352,2 ± 65,3	40	16	10,2 ± 1,4
S9	732,5 ± 83,9	72	28,84	11,3 ± 1,8
RMS	424,9 ± 53,9	-	-	8,6 ± 1,5

Los criterios actuales para los valores de intervalo de control saludable (intercuartil) son para i) DBP sérica 193,5-4345,0 g/ml (mediana 423,5 pg/ml; 354,1-586 pg/ml), y para ii) 25(OH)D₃ sérica 30-100 ng/ml (intervalo normal), 20-30 ng/ml (insuficiencia), < 20 ng/ml (deficiencia). Por consiguiente, se consideró que la muestra S3 tenía niveles normales de 25(OH)D₃; S9, insuficiente; S8 y S6, niveles deficientes. En otras palabras, de niveles más altos a más bajos de 25(OH)D₃: S3>S9>S8>S6. De los resultados pudo concluirse que el nivel de DBP total parecía no estar correlacionado con el nivel de 25(OH)D₃ en muestras de suero humano.

Aunque estrictamente no es posible realizar una comparación directa ya que se midieron diferentes analitos mediante diferentes métodos, cabe señalar que pudo encontrarse una correlación en los niveles del complejo ternario DBP:25(OH)VD:megalina M2 en las muestras en comparación con valores de 25(OH)D₃; de niveles más altos a más bajos del complejo ternario S3>S9>S8>S6, idéntico tal como se determina para niveles de 25(OH)D₃. Esto respalda adicionalmente la noción de que megalina sólo interactúa *in vitro* con DBP cuando la prohormona está unida, proporcionando un nuevo estado de vitamina D fisiológicamente activa y endocitable, que describe la biodisponibilidad de la prohormona en la circulación.

La correlación entre los niveles séricos de 25(OH)VD₃ y el complejo ternario se analizaron adicionalmente los niveles séricos y el complejo ternario; véase el gráfico en la figura 7B. Una correlación lineal entre los niveles séricos de 25(OH)VD₃ y se determinó DBP:25(OH)VD:megalina M2 (R²=0,8897), lo que indica que el método puede

proporcionar información precisa que puede compararse o relacionarse con valores convencionales para obtener una medición del estado de vitamina D activable de un sujeto.

Además, se examinó el intervalo de linealidad de la interacción entre megalina y DBP usando el método reivindicado para 25-hidroxivitamina D₃ (25(OH)VD₃), 25-hidroxivitamina D₂ (25(OH)VDBP) y 24,25-dihidroxivitamina D (24,25(OH)VD). Los ELISA para el complejo DBP:VD:megalina se realizaron tal como se da a conocer. En resumen: una placa de microtitulación recubierta con fragmento de megalina M2 purificado se incubó con una mezcla de DBP y diluciones en serie de 25(OH)VD₂, 25(OH)VD₃ o 24,25(OH)VD. Para la determinación del complejo ternario se utilizaron un anticuerpo anti-DBP policlonal de conejo y un anticuerpo de burro anti-IgG de conejo conjugado con HRP. Los resultados se muestran en la figura 7C. Para todos los metabolitos de vitamina D, el ensayo fue lineal hasta 50 ng/ml. El límite de sensibilidad determinado fue de 2,0 ng/ml.

Las propiedades de unión de DBP y 25(OH)VD₃, 25(OH)VD₂, 24,25(OH)VD y epímero 3C de 25(OH)D₃ por un lado y megalina por el otro se examinaron más a fondo usando termoforesis a microescala. Los resultados se muestran en las figuras 8 A, B. La DBP purificada se marcó con colorante fluorescente rojo NT-647. Los metabolitos de vitamina D se titularon con diferentes concentraciones. La constante de disociación K_d se calculó para cada compañero de interacción. La afinidad de unión se evaluó a través de la constante de disociación K_d obtenida. Los resultados muestran que la afinidad de interacción de DBP con 25(OH)VD₃ (K_d = 1,88 +/- 0,28 nM) o 25(OH)VDBP (K_d = 2,81 +/- 0,681 nM) fueron comparables, mientras que la interacción con 24,25(OH)VD pareció ser ligeramente más débil. El 3C-epi25(OH)VD₃ se unió más fuertemente.

La afinidad de DBP al interactuar con 25(OH)VD₃, 25(OH)VD₂ o 24,25-24,25(OH)VD, epímero 3C de 25(OH)D₃ y megalina M2 también se analizó por termoforesis a microescala. Los resultados se muestran en la figura 8B. La DBP purificada (50 nM) se marcó con el colorante fluorescente rojo NT-647 y se mezcló con cualquiera de los metabolitos de vitamina D (37,8 nM). Megalina purificada mostrada en la figura 7C. Para todos los metabolitos de vitamina D, el ensayo fue lineal hasta 50 ng/ml. El límite de sensibilidad determinado fue de 2,0 ng/ml.

Las propiedades de unión de DBP y 25(OH)VD₃, 25(OH)VD₂, 24,25(OH)VD y epímero 3C de 25(OH)D₃ por un lado y megalina por el otro se examinaron más a fondo usando termoforesis a microescala. Los resultados se muestran en las figuras 8 A, B. La DBP purificada se marcó con colorante fluorescente rojo NT-647. Los metabolitos de vitamina D se titularon con diferentes concentraciones. La constante de disociación K_d se calculó para cada compañero de interacción. La afinidad de unión se evaluó a través de la constante de disociación K_d obtenida. Los resultados muestran que la afinidad de interacción de DBP con 25(OH)VD₃ (K_d = 1,88 +/- 0,28 nM) o 25(OH)VDBP (K_d = 2,81 +/- 0,681 nM) fueron comparables, mientras que la interacción con 24,25(OH)VD pareció ser ligeramente más débil. El 3C-epi25(OH)VD₃ se unió más fuertemente.

La afinidad de DBP al interactuar con 25(OH)VD₃, 25(OH)VD₂ o 24,25-24,25(OH)VD, epímero 3C de 25(OH)D₃ y megalina M2 también se analizó por termoforesis a microescala. Los resultados se muestran en la figura 8B. La DBP purificada (50 nM) se marcó con el colorante fluorescente rojo NT-647 y se mezcló con cualquiera de los metabolitos de vitamina D (37,8 nM). La megalina M2 purificada se tituló en diferentes concentraciones. Se calculó la constante de disociación K_d para cada condición. La afinidad de unión se evaluó mediante la constante de disociación K_d. Los análisis muestran que la afinidad de unión del fragmento de megalina M2 al complejo DBP:25(OH)VD₃ es mucho más fuerte (K_d = 33,7 +/- 20,7 nM) que el complejo DBP:25(OH)VD₂ (K_d = 160 +/- 22,7 nM), o -/DBP-24,25VD (K_d = 171 +/- 24,6 nM). Se observó una afinidad muy alta por el epímero 3C que requerirá más investigación.

Estos experimentos demuestran que la unión de megalina a DBP sólo tiene lugar cuando se une a la prohormona. Este complejo ternario puede ser detectado y cuantificado por cualquier método de determinación de proteínas. En vista de lo anterior, el uso de megalina permite una medición fiable de la vitamina D fisiológicamente activada, digamos 25-hidroxivitamina D₃, ya que representa la forma más activa de vitamina D en la circulación. El método dado a conocer proporciona la medición diferencial de otros metabolitos de vitamina D que también es relevante en vista de la vitamina DBP en los suplementos alimenticios.

La megalina o fragmentos de la misma se usan para discernir el estado de vitamina D efectivo. Los fragmentos de megalina descritos pueden producirse fácilmente por métodos recombinantes e incluso por síntesis química. Los fragmentos de megalina descritos permanecieron solubles en disolución acuosa, de modo que pueden usarse las condiciones cercanas a las fisiológicas. Ya no existe la necesidad de una liberación de vitamina D de sus parejas de unión, como requerían los métodos de la técnica anterior. Por tanto, no se necesitan disolventes ni tensioactivos para el desplazamiento de la vitamina D de sus parejas de unión. Por consiguiente, la medición del estado de vitamina D no se verá interferida por productos químicos no fisiológicos. No son necesarias etapas de purificación ni técnicas costosas y que requieren mucho tiempo, tal como LC-MS. Puede realizarse una determinación directa y rápida del estado de vitamina D efectivo inmediatamente después de la obtención de muestras. Los principios dados a conocer pueden además adaptarse fácilmente a las plataformas y autómatas disponibles.

Como otros ligandos además de DBP también pueden unirse a megalina, se ha mapeado adicionalmente más de cerca las regiones de unión o el epítipo dentro de la región M2. Los resultados están contenidos en la secuencia proporcionada para los epítopos de unión. Además, se han sometido a prueba epítopos de unión mínima.

EJEMPLO 5

Producción de fragmentos de megalina recombinante. Los fragmentos de ADNc de megalina (LRP2) se amplificaron mediante RT-PCR usando ARNm de células Caco-2 (células epiteliales de carcinoma de colon humano). Para la síntesis de la transcripción de ADNc se usó el kit de síntesis de ADNc de la primera cadena Maxima H Minus (Thermo Scientific). Este kit permite la síntesis de ADNc de hasta 20 kb. Se usaron cebadores Oligo dt18 y 65C. Para las reacciones de PCR se usó el kit de PCR de alta fidelidad Platinum PCR Supermix (Invitrogen). ADNc de megalina M1: 1158 pb; ADNc de megalina M2: 1215 pb; ADNc de megalina M3: 1482 pb.

Los fragmentos de ADNc de megalina se clonaron con una etiqueta His C-terminal en pcDNA3.1 y los plásmidos clonados se transfectaron en células HEK293 de mamífero. La siguiente estrategia de clonación se aplicó al clon de ADNc de megalina M2 que codificaba para la secuencia de aminoácidos 1024-1429 de LRP2/megalina humana (SEQ ID NO: 09), y dio como resultado el constructo que tenía: péptido señal (25 aminoácidos) + E1024-K1429 + etiqueta 6x His. La clonación se realizó usando secuencias generadas por PCR.

La selección de la línea celular estable se llevó a cabo usando neomicina (G418, 800 µg/ml). Los sobrenadantes de cultivos celulares o los lisados celulares se purificaron con resina Ni-NTA. El análisis de los fragmentos M1, M2, M3 de la proteína megalina que tenían una etiqueta 6xHis se realizó mediante inmunotransferencia de tipo Western con un anticuerpo contra la etiqueta 6xHis (Cohesion Biosciences). Los sobrenadantes de cultivos celulares o lisados celulares se purificaron con agarosa Ni-NTA (Thermo Fischer Scientific). Los lisados celulares o el sobrenadante del cultivo (0,5 - 2 ml) se incubaron con 50 µl de resina Ni-NTA preequilibrada a 4°C durante la noche. La resina se lavó 3 veces con tampón H + imidazol 20 mM. El complejo de proteína megalina se eluyó con tampón H que contenía imidazol 200 mM y el tampón se intercambió con PBS 1X. Las disoluciones de proteínas se liofilizaron o se mantuvieron a 4°C antes de su uso.

El fragmento M2 se mapeó adicionalmente para los principales epítomos de unión de los ligandos de megalina dentro de la región M2, la región de megalina que se une a la DBP humana. Se eliminaron los sitios de unión de otros ligandos de megalina y se identificaron los epítomos para la unión de DBP humana. Es importante que los epítomos mínimos no se superpongan con los epítomos de unión de otros ligandos de megalina. Los resultados se muestran en las tablas siguientes.

TABLA 2

<i>Principales epítomos de unión de los ligandos de megalina dentro de la región M2 (aa E1024-K1429)</i>		
DBP humana	Epítomo 1	G-C-T-H-E- C-V-Q-E-P -F-G-A-K-C
	Epítomo 2	D-N-G-N-C- I-H-R-A-W -L-C-D-R-D
Ac de conejo anti-hDBP-IgG (Immunodiagnostik)	A19-A20	Y-T-C-D-N-H-Q-C-I-S-K-N- W-V -C-D- T - D-N-D
Ig humana κC	C8:	M-S-D-E-K-D-C-P-T-Q-P-F-R-C-P
C1q humano	A19 B22	Y-T-C-D-N-H-Q-C-I-S-K-N-W-V-C E-C-D-G-H-P-D-C-L-Y-G-S-D-E-H
Albúmina humana-etiqueta His	Epítomo1 (B22):	E-C-D-G-H-P-D-C-L-Y-G-S-D-E-H
	Epítomo 2 (C24-D1):	F-L-L-A-N-D-S-K-T-C-E-D-I-D-E-C-D-I-L-G
RAP humano	Epítomo 1 (B18-B19):	M-C-H-S-D-E-F-Q-C-Q-E-D-G-I-C-I-P-N-F-W
	Epítomo2 (D8):	C-D-T-G-Y-M-L-E-S-D-G-R-T-C-K
ApoE humano	Epítomo1 (AH):	C-G-H-G-E-C-I-P-A-H-W-R-C-D-K
	Epítomo2 (D3):	C-D-I-L-G-S-C-S-Q-H-C-Y-N-M-R
	Epítomo2 (D8):	C-D-T-G-Y-M-L-E-S-D-G-R-T-C-K
HPT humana	Epítomo1 (B22):	E-C-D-G-H-P-D-C-L-Y-G-S-D-E-H

5

TABLA 3

Mapeo de epítomos de ligandos que se unen a la región de megalina M2 humana (aa E1024-K1429)

Clase de receptor de LDL A8 EQCGLFS FPCKNGRCVPNYYLCDGVDDCHDNSDEQLCG
(1024-1061)

Clase de receptor de LDL A9 TLNNTCSSAFT CGHGECIPAHWRCDK RNDCVDGSDEHNCP
(1066-1102) *Apo E*

Clase de receptor de LDL A10 THAPASCLDTQ YTCDNHQCISKNWV CDTDNDCGDSDEKNCN
(1108-1144) *C1q*

Clase de receptor de LDL A11 STETCQPSQFNCPNHR CIDLSFVCDG
(1148-1184) DKDCVDGSDEVGCV

Clase de receptor de LDL A12 LNCTASQFKCASGDKCIGVTNRCDGVFDCSDNSDEAGCP
(1186-1223)

Clase de receptor de LDL A13 TRPPG MCHSDEFQCQEDGICIPNFW ECDGHPDCLYGSDEHNACV
(1229-1267) *RAP* *Albúmina/C1q/PTH*

Clase de receptor de LDL A14 PKTCPSSYFHC DNGNCIHRWLCDRD NDCGD MSDEKDCP
(1270-1306) *DPB* *Ig κC*

Clase de receptor de LDL A15 TQPFRCPS WQWQCLGHNICVNLWCDGIFDCPNGTDESPLCN
(1304-1349) *Ig κC*

Dominio especial (1350-1389) GNSCDFNGG GCTHECVQEPFGAKC KCLPLGFLANDSKTCE
DPB *Albúmina*

similar a EGF1; unión a calcio ...DIDE CDILGSCSQHCYNMRGSRFCSDTGYMLES DGRICK
(1390-1429) *Albúmina* *Apo E* *RAP*

- 10 Los epítomos mínimos dentro de la región de megalina M2 para una unión de DBP humana se enumeran en la tabla a continuación.

TABLA 4

Lista de péptidos-megalina-M2 clonados y expresados como polipéptidos de fusión con furina		
Nombre	Secuencia de péptidos	ADNc de péptido
Péptido 1-15aa	DNGNCIHRWLCDRD	GACAACGGAACTGCATCCAC AGGGCATGGCTCTGTGATCGG GAC
Péptido 2-15aa	GCTHECVQEPFGAKC	GGTGTACTCACGAGTGTGTT CAAGAGCCCTTTGGGGCTAAA TGC
Péptido 3-30aa	KTCPSSYFHC DNGNCIHR AWLCDRD NDCGD	aagacttgccctcatcatattccactgtgac aacggaaactgcaccacagggcatggctc tgtgatcgggacaatgactgcgggat
Péptido 4-30aa	SDFNGGCTHECVQEPFGA KCLPLGFLAN	tcagattcaatggtggtgtactcacgagtgt gttcaagagcccttggggctaaatgcctatg tcattgggattcttacttgccaat

15

EJEMPLO 6

Ensayo de unión ELISA del complejo de megalina. Se recubrieron las placas de microtitulación con fragmento M1 o M2 de megalina purificado soluble (1 µg/100 µl diluido en PBS1X) mediante incubación a TA durante 2 h. Se mezclaron diluciones seriadas de 25-hidroxivitamina D₃ (VD₃) 0, 0,3125, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 ng en 100 µl de PBS cada uno con 1 µg de DBP (DBP). Se incubó la muestra a 37°C durante 1 hora. Los sitios de unión no

20

específicos se bloquearon con tampón de bloqueo (BSA al 1 % en PBS1X) a TA durante 1 h. Se añadieron la mezcla de DBP-VD₃ o muestras de suero a los pocillos recubiertos con megalina y se incubaron a 4°C durante la noche. Después de lavar con tampón PBST (Tween 20 al 0,05% en PBS), se añadieron 100 µl de anticuerpo anti-DBP de conejo (diluido 1:3500 en tampón de bloqueo) y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Después de lavar con PBST, se añadieron 100 µl de anticuerpo secundario de burro anti-IgG de conejo conjugado con HRP (diluido 1:500 en tampón de bloqueo) y se incubó a 37°C durante 1 hora. Se añadieron 100 µl de reactivo sustrato A+B (1:1) (R&D) y se incubaron a TA durante 30 min. Luego, se añadieron 100 µl de disolución de parada a los pocillos. La absorbancia se leyó a 450 nm. Los valores se compararon con valores convencionales de concentración de 25-hidroxivitamina D₃ conocida.

EJEMPLO 7

Coinmunoprecipitación de DBP de suero humano con megalina soluble purificada recombinante. El fragmento de proteína M1 o M2 de megalina soluble purificado con Ni-NTA (3 µg) se mezcló en primer lugar con muestras de suero o plasma humano (30 µl). Estas muestras se incubaron con 50 µl de resina Ni-NTA preequilibrada a 4°C durante la noche. La resina se lavó 3 veces con tampón H + imidazol 20 mM. El complejo unido se eluyó con tampón H que contenía imidazol 200 mM y se analizó mediante inmunotransferencia de tipo Western con un anticuerpo policlonal de conejo contra DBP (Abcam).

EJEMPLO 8

Ensayo de inmunoturbidimetría para la determinación del estado de vitamina D con megalina soluble. El fragmento de proteína M1 o M2 de megalina soluble purificado con Ni-NTA (3 µg) se mezcla en primer lugar con muestras de suero o plasma humano (30 µl). Las muestras se incuban con 50 µl de resina Ni-NTA preequilibrada a 4°C durante la noche. La resina se lava 3 veces con tampón H + imidazol 20 mM. El complejo unido se eluye con tampón H que contiene imidazol 200 mM. El complejo eluido se pone en contacto en disolución acuosa con un anticuerpo contra la proteína de unión a vitamina D. El aumento de la turbidez se mide con un turbidímetro convencional y se compara con valores convencionales de concentración de 25-hidroxivitamina D₃ conocida.

Alternativamente, las nanopartículas, por ejemplo, las nanopartículas de látex (aprox. 150 nm), se recubren con fragmentos de megalina M1 o M2 y se incuban con una muestra de suero o plasma. Luego se mide el aumento de la turbidez y se compara con los valores convencionales de concentración de 25-hidroxivitamina D₃ conocida.

EJEMPLO 9

Ensayo de unión ELISA para la determinación del intervalo de linealidad. Se recubrió una placa de microtitulación con fragmento de proteína megalina M1 o M2 purificado (1 µg/100 µl diluido en PBS1X) mediante incubación a TA durante 2 h. Se prepararon mezclas de DBP y 25-hidroxivitamina D₃ (VD₃), 25-hidroxivitamina D₂ (VD₂) o 24,25-hidroxivitamina D (24,25VD) mezclando 20 µg de DBP y diluciones en serie de VD (0, 0,78, 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 ng) en 100 µl de PBS. Se incubó la muestra a 37°C durante 1 hora. Después del bloqueo de la placa, la mezcla de DBP-VD preparada anteriormente se añadió a pocillos recubiertos con megalina y se incubó a 4°C durante la noche. Luego, la placa se incubó con 100 µl de anticuerpo anti-DBP de conejo diluido (1:1000 diluido en tampón de bloqueo) a TA durante 2 h, seguido de incubación con 100 µl de anticuerpo anti-DBP de burro conjugado con HRP (1:500 diluido en tampón de bloqueo) a 37°C, 1 h. Después de la reacción del sustrato, se leyó la absorbancia a 450 nm. El ensayo fue lineal hasta 50 ng/ml. Se determinó que el límite de sensibilidad era de 2,0 ng/ml.

EJEMPLO 10

Ensayo de termoforesis a microescala. Se marcó DBP purificada (Merck, 345802) con el colorante fluorescente rojo NT-647 usando un rojo de kit de marcaje de proteínas Monolith (NanoTemper Technologies, Múnich, DE). Los fragmentos de megalina purificados con Ni-NTA (M1, M2) se titularon en el intervalo de 0,488 a 1000 nmol/l. Se marcó DBP purificada (Merck, 345802) como se marcó con el colorante fluorescente rojo NT-647 usando el rojo de kit de marcaje de proteínas Monolith. Se tituló 25-hidroxivitamina D₃ (VD₃) en concentraciones en el intervalo de 0,0488 a 100 nmol/l. Se titularon 25-hidroxivitamina D₂ (VD₂), 24,25-hidroxivitamina D (24,25VD) y 3epi25(OH)VD₃ en concentraciones en el intervalo de 0,0163 a 37 nmol/l. 37,8 nM de VD₃, VD₂ y se añadió respectivamente 24,25VD a 50 nM de DBP marcada con NT-647. Para las mediciones se usó un dispositivo Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies). Para el análisis se utilizó el software NT Analysis versión 1.427 (NanoTemper Technologies). Parámetros: potencia del láser, 100%; LED, 80; encendido del láser, 30 segundos; apagado del láser, 5 segundos; temperatura, 25°C. FNorm: fluorescencia normalizada; Kd: constante de disociación.

Las constantes de disociación Kd de los metabolitos de vitamina D a DBP dieron la siguiente clasificación de las afinidades de unión. 3epi25(OH)₂VD₃ > 25(OH)₂VD₃ ≥ 25(OH)₂VD₂ > 24,25(OH)₂VD₃ > 1,25(OH)₂VD₃. La afinidad de unión de DBP-VD₂ es comparable a Kd de DBP-VD₃. La unión de 24,25(OH)VD a DBP es marginalmente menor. La alta afinidad de unión del epímero 3C de 25(OH)D₃ es sorprendente y requerirá más investigación ya que este

epímero parece particularmente útil como suplemento alimenticio, si no tóxico por otras razones.

5 Lista de secuencias

<110> Immundiagnostik AG

<120> Método de medición del estado de vitamina D endocítica

<130> IDK00126PC00

<150> DE102018100096.0

<151> 03-01-2018

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Asp	Asn	Gly	Asn	Cys	Ile	His	Arg	Ala	Trp	Leu	Cys	Asp	Arg	Asp
1				5					10					15

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Gly	Cys	Thr	His	Glu	Cys	Val	Gln	Glu	Pro	Phe	Gly	Ala	Lys	Cys
1				5					10					15

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Cys	Val	Gln	Glu	Pro
1				5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Ile	His	Arg	Ala	Trp
1				5

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Ser	Asp	Phe	Asn	Gly	Gly	Cys	Thr	His	Glu	Cys	Val	Gln	Glu	Pro
1				5					10					15

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

ES 2 927 217 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Cys Tyr Asn Met Arg Gly Ser Phe Arg Cys Ser Cys Asp Thr Gly
1 5 10 15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

Phe Ser Phe Pro Cys Lys Asn Gly Arg Cys Val Pro Asn Tyr Tyr
1 5 10 15

<210> 8

<211> 391

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Met Asp Arg Gly Pro Ala Ala Val Ala Cys Thr Leu Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

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

Phe Arg Cys Gly Ser Gly His Cys Ile Pro Ala Asp Trp Arg Cys Asp
35 40 45

Gly Thr Lys Asp Cys Ser Asp Asp Ala Asp Glu Ile Gly Cys Ala Trp
50 55 60

Thr Cys Gln Gln Gly Tyr Phe Lys Cys Gln Ser Glu Gly Gln Cys Ile
65 70 75 80

Pro Asn Ser Val Trp Cys Asp Gln Asp Gln Asp Cys Asp Asp Gly Ser
85 90 95

ES 2 927 217 T3

Asp Glu Arg Gln Asp Cys Ser Gln Ser Thr Cys Ser Ser His Gln Ile
 100 105 110
 Thr Cys Ser Asn Gly Gln Cys Ile Pro Ser Glu Tyr Arg Cys Asp His
 115 120 125
 Val Arg Asp Cys Pro Asp Gly Ala Asp Glu Asn Asp Cys Gln Tyr Pro
 130 135 140
 Thr Cys Glu Gln Leu Thr Cys Asp Asn Gly Ala Cys Tyr Asn Thr Ser
 145 150 155 160
 Gln Lys Cys Asp Trp Lys Val Asp Cys Arg Asp Ser Ser Asp Glu Ile
 165 170 175
 Asn Cys Thr Glu Ile Cys Leu His Asn Glu Phe Ser Cys Gly Asn Gly
 180 185 190
 Glu Cys Ile Pro Arg Ala Tyr Val Cys Asp His Asp Asn Asp Cys Gln
 195 200 205
 Asp Gly Ser Asp Glu His Ala Cys Asn Tyr Pro Thr Cys Gly Gly Tyr
 210 215 220
 Gln Phe Thr Cys Pro Ser Gly Arg Cys Ile Tyr Gln Asn Trp Val Cys
 225 230 235 240
 Asp Gly Glu Asp Asp Cys Lys Asp Asn Gly Asp Glu Asp Gly Cys Glu
 245 250 255
 Ser Gly Pro His Asp Val His Lys Cys Ser Pro Arg Glu Trp Ser Cys
 260 265 270
 Pro Glu Ser Gly Arg Cys Ile Ser Ile Tyr Lys Val Cys Asp Gly Ile
 275 280 285
 Leu Asp Cys Pro Gly Arg Glu Asp Glu Asn Asn Thr Ser Thr Gly Lys
 290 295 300
 Tyr Cys Ser Met Thr Leu Cys Ser Ala Leu Asn Cys Gln Tyr Gln Cys
 305 310 315 320
 His Glu Thr Pro Tyr Gly Gly Ala Cys Phe Cys Pro Pro Gly Tyr Ile
 325 330 335

ES 2 927 217 T3

Ile Asn His Asn Asp Ser Arg Thr Cys Val Glu Phe Asp Asp Cys Gln
340 345 350

Ile Trp Gly Ile Cys Asp Gln Lys Cys Glu Ser Arg Pro Gly Arg His
355 360 365

Leu Cys His Cys Glu Glu Gly Tyr Ile Leu Glu Arg Gly Gln Tyr Cys
370 375 380

Lys His His His His His His
385 390

<210> 9

<211> 452

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

Met Asp Arg Gly Pro Ala Ala Val Ala Cys Thr Leu Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

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

Phe Arg Cys Gly Ser Gly His Cys Glu Gln Cys Gly Leu Phe Ser Phe
35 40 45

Pro Cys Lys Asn Gly Arg Cys Val Pro Asn Tyr Tyr Leu Cys Asp Gly
50 55 60

Val Asp Asp Cys His Asp Asn Ser Asp Glu Gln Leu Cys Gly Thr Leu
65 70 75 80

Asn Asn Thr Cys Ser Ser Ser Ala Phe Thr Cys Gly His Gly Glu Cys
85 90 95

Ile Pro Ala His Trp Arg Cys Asp Lys Arg Asn Asp Cys Val Asp Gly
100 105 110

Ser Asp Glu His Asn Cys Pro Thr His Ala Pro Ala Ser Cys Leu Asp
115 120 125

Thr Gln Tyr Thr Cys Asp Asn His Gln Cys Ile Ser Lys Asn Val Trp
130 135 140

5

10

ES 2 927 217 T3

Cys Asp Thr Asp Asn Asp Cys Gly Asp Gly Ser Asp Glu Lys Asn Cys
 145 150 155 160
 Asn Ser Thr Glu Thr Cys Gln Pro Ser Gln Phe Asn Cys Pro Asn His
 165 170 175
 Arg Cys Ile Asp Leu Ser Phe Val Cys Asp Gly Asp Lys Asp Cys Val
 180 185 190
 Asp Gly Ser Asp Glu Val Gly Cys Val Leu Asn Cys Thr Ala Ser Gln
 195 200 205
 Phe Lys Cys Ala Ser Gly Asp Lys Cys Ile Gly Val Thr Asn Arg Cys
 210 215 220
 Asp Gly Val Phe Asp Cys Ser Asp Asn Ser Asp Glu Ala Gly Cys Pro
 225 230 235 240
 Thr Arg Pro Pro Gly Met Cys His Ser Asp Glu Phe Gln Cys Gln Glu
 245 250 255
 Asp Gly Ile Cys Ile Pro Asn Phe Trp Glu Cys Asp Gly His Pro Asp
 260 265 270
 Cys Leu Tyr Gly Ser Asp Glu His Asn Ala Cys Val Pro Lys Thr Cys
 275 280 285
 Pro Ser Ser Tyr Phe His Cys Asp Asn Gly Asn Cys Ile His Arg Ala
 290 295 300
 Trp Leu Cys Asp Arg Asp Asn Asp Cys Gly Asp Met Ser Asp Glu Lys
 305 310 315 320
 Asp Cys Pro Thr Gln Pro Phe Arg Cys Pro Ser Trp Gln Trp Gln Cys
 325 330 335
 Leu Gly His Asn Ile Cys Val Asn Leu Ser Val Val Cys Asp Gly Ile
 340 345 350
 Phe Asp Cys Pro Asn Gly Thr Asp Glu Ser Pro Leu Cys Asn Gly Asn
 355 360 365
 Ser Cys Ser Asp Phe Asn Gly Gly Cys Thr His Glu Cys Val Gln Glu
 370 375 380

ES 2 927 217 T3

Pro Phe Gly Ala Lys Cys Leu Cys Pro Leu Gly Phe Leu Leu Ala Asn
385 390 395 400

Asp Ser Lys Thr Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys Asp Ile Leu Gly Ser
405 410 415

Cys Ser Gln His Cys Tyr Asn Met Arg Gly Ser Phe Arg Cys Ser Cys
420 425 430

Asp Thr Gly Tyr Met Leu Glu Ser Asp Gly Arg Thr Cys Lys His His
435 440 445

His His His His
450

<210> 10

<211> 541

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Met Asp Arg Gly Pro Ala Ala Val Ala Cys Thr Leu Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

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

Phe Arg Cys Gly Ser Gly His Cys Glu Arg Cys Gly Ala Ser Ser Phe
35 40 45

Thr Cys Ser Asn Gly Arg Cys Ile Ser Glu Glu Trp Lys Cys Asp Asn
50 55 60

Asp Asn Asp Cys Gly Asp Gly Ser Asp Glu Met Glu Ser Val Cys Ala
65 70 75 80

Leu His Thr Cys Ser Pro Thr Ala Phe Thr Cys Ala Asn Gly Arg Cys
85 90 95

Val Gln Tyr Ser Tyr Arg Cys Asp Tyr Tyr Asn Asp Cys Gly Asp Gly
100 105 110

Ser Asp Glu Ala Gly Cys Leu Phe Arg Asp Cys Asn Ala Thr Thr Glu
115 120 125

ES 2 927 217 T3

Phe Met Cys Asn Asn Arg Arg Cys Ile Pro Arg Glu Phe Ile Cys Asn
 130 135 140

Gly Val Asp Asn Cys His Asp Asn Asn Thr Ser Asp Glu Lys Asn Cys
 145 150 155 160

Pro Asp Arg Thr Cys Gln Ser Gly Tyr Thr Lys Cys His Asn Ser Asn
 165 170 175

Ile Cys Ile Pro Arg Val Tyr Leu Cys Asp Gly Asp Asn Asp Cys Gly
 180 185 190

Asp Asn Ser Asp Glu Asn Pro Thr Tyr Cys Thr Thr His Thr Cys Ser
 195 200 205

Ser Ser Glu Phe Gln Cys Ala Ser Gly Arg Cys Ile Pro Gln His Trp
 210 215 220

Tyr Cys Asp Gln Glu Thr Asp Cys Phe Asp Ala Ser Asp Glu Pro Ala
 225 230 235 240

Ser Cys Gly His Ser Glu Arg Thr Cys Leu Ala Asp Glu Phe Lys Cys
 245 250 255

Asp Gly Gly Arg Cys Ile Pro Ser Glu Trp Ile Cys Asp Gly Asp Asn
 260 265 270

Asp Cys Gly Asp Met Ser Asp Glu Asp Lys Arg His Gln Cys Gln Asn
 275 280 285

Gln Asn Cys Ser Asp Ser Glu Phe Leu Cys Val Asn Asp Arg Pro Pro
 290 295 300

Asp Arg Arg Cys Ile Pro Gln Ser Trp Val Cys Asp Gly Asp Val Asp
 305 310 315 320

Cys Thr Asp Gly Tyr Asp Glu Asn Gln Asn Cys Thr Arg Arg Thr Cys
 325 330 335

Ser Glu Asn Glu Phe Thr Cys Gly Tyr Gly Leu Cys Ile Pro Lys Ile
 340 345 350

Phe Arg Cys Asp Arg His Asn Asp Cys Gly Asp Tyr Ser Asp Glu Arg
 355 360 365

ES 2 927 217 T3

Gly Cys Leu Tyr Gln Thr Cys Gln Gln Asn Gln Phe Thr Cys Gln Asn
370 375 380

Gly Arg Cys Ile Ser Lys Thr Phe Val Cys Asp Glu Asp Asn Asp Cys
385 390 395 400

Gly Asp Gly Ser Asp Glu Leu Met His Leu Cys His Thr Pro Glu Pro
405 410 415

Thr Cys Pro Pro His Glu Phe Lys Cys Asp Asn Gly Arg Cys Ile Glu
420 425 430

Met Met Lys Leu Cys Asn His Leu Asp Asp Cys Leu Asp Asn Ser Asp
435 440 445

Glu Lys Gly Cys Gly Ile Asn Glu Cys His Asp Pro Ser Ile Ser Gly
450 455 460

Cys Asp His Asn Cys Thr Asp Thr Leu Thr Ser Phe Tyr Cys Ser Cys
465 470 475 480

Arg Pro Gly Tyr Lys Leu Met Ser Asp Lys Arg Thr Cys Val Asp Ile
485 490 495

Asp Glu Cys Thr Glu Met Pro Phe Val Cys Ser Gln Lys Cys Glu Asn
500 505 510

Val Ile Gly Ser Tyr Ile Cys Lys Cys Ala Pro Gly Tyr Leu Arg Glu
515 520 525

Pro Asp Gly Lys Thr Cys Arg His His His His His His
530 535 540

<210> 11

<211> 346

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

Ile Pro Ala Asp Trp Arg Cys Asp Gly Thr Lys Asp Cys Ser Asp Asp
1 5 10 15

Ala Asp Glu Ile Gly Cys Ala Val Val Thr Cys Gln Gln Gly Tyr Phe
20 25 30

10

ES 2 927 217 T3

Lys Cys Gln Ser Glu Gly Gln Cys Ile Pro Asn Ser Trp Val Cys Asp
 35 40 45
 Gln Asp Gln Asp Cys Asp Asp Gly Ser Asp Glu Arg Gln Asp Cys Ser
 50 55 60
 Gln Ser Thr Cys Ser Ser His Gln Ile Thr Cys Ser Asn Gly Gln Cys
 65 70 75 80
 Ile Pro Ser Glu Tyr Arg Cys Asp His Val Arg Asp Cys Pro Asp Gly
 85 90 95
 Ala Asp Glu Asn Asp Cys Gln Tyr Pro Thr Cys Glu Gln Leu Thr Cys
 100 105 110
 Asp Asn Gly Ala Cys Tyr Asn Thr Ser Gln Lys Cys Asp Trp Lys Val
 115 120 125
 Asp Cys Arg Asp Ser Ser Asp Glu Ile Asn Cys Thr Glu Ile Cys Leu
 130 135 140
 His Asn Glu Phe Ser Cys Gly Asn Gly Glu Cys Ile Pro Arg Ala Tyr
 145 150 155 160
 Val Cys Asp His Asp Asn Asp Cys Gln Asp Gly Ser Asp Glu His Ala
 165 170 175
 Cys Asn Tyr Pro Thr Cys Gly Gly Tyr Gln Phe Thr Cys Pro Ser Gly
 180 185 190
 Arg Cys Ile Tyr Gln Asn Trp Val Cys Asp Gly Glu Asp Asp Cys Lys
 195 200 205
 Asp Asn Gly Asp Glu Asp Gly Cys Glu Ser Gly Pro His Asp Val His
 210 215 220
 Lys Cys Ser Pro Arg Glu Trp Ser Cys Pro Glu Ser Gly Arg Cys Ile
 225 230 235 240
 Ser Ile Tyr Lys Val Cys Asp Gly Ile Leu Asp Cys Pro Gly Arg Glu
 245 250 255
 Asp Glu Asn Asn Thr Ser Thr Gly Lys Tyr Cys Ser Met Thr Leu Cys
 260 265 270

ES 2 927 217 T3

Ser Ala Leu Asn Cys Gln Tyr Gln Cys His Glu Thr Pro Tyr Gly Gly
275 280 285

Ala Cys Phe Cys Pro Pro Gly Tyr Ile Ile Asn His Asn Asp Ser Arg
290 295 300

Thr Cys Val Glu Phe Asp Asp Cys Gln Ile Trp Gly Ile Cys Asp Gln
305 310 315 320

Lys Cys Glu Ser Arg Pro Gly Arg His Leu Cys His Cys Glu Glu Gly
325 330 335

Tyr Ile Leu Glu Arg Gly Gln Tyr Cys Lys
340 345

<210> 12

<211> 406

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

Glu Gln Cys Gly Leu Phe Ser Phe Pro Cys Lys Asn Gly Arg Cys Val
1 5 10 15

Pro Asn Tyr Tyr Leu Cys Asp Gly Val Asp Asp Cys His Asp Asn Ser
20 25 30

Asp Glu Gln Leu Cys Gly Thr Leu Asn Asn Thr Cys Ser Ser Ser Ala
35 40 45

Phe Thr Cys Gly His Gly Glu Cys Ile Pro Ala His Trp Arg Cys Asp
50 55 60

Lys Arg Asn Asp Cys Val Asp Gly Ser Asp Glu His Asn Cys Pro Thr
65 70 75 80

His Ala Pro Ala Ser Cys Leu Asp Thr Gln Tyr Thr Cys Asp Asn His
85 90 95

Gln Cys Ile Ser Lys Asn Trp Val Cys Asp Thr Asp Asn Asp Cys Gly
100 105 110

Asp Gly Ser Asp Glu Lys Asn Cys Asn Ser Thr Glu Thr Cys Gln Pro
115 120 125

Ser Gln Phe Asn Cys Pro Asn His Arg Cys Ile Asp Leu Ser Phe Val
130 135 140

ES 2 927 217 T3

Cys Asp Gly Asp Lys Asp Cys Val Asp Gly Ser Asp Glu Val Gly Cys
 145 150 155 160
 Val Leu Asn Cys Thr Ala Ser Gln Phe Lys Cys Ala Ser Gly Asp Lys
 165 170 175
 Cys Ile Gly Val Thr Asn Arg Cys Asp Gly Val Phe Asp Cys Ser Asp
 180 185 190
 Asn Ser Asp Glu Ala Gly Cys Pro Thr Arg Pro Pro Gly Met Cys His
 195 200 205
 Ser Asp Glu Phe Gln Cys Gln Glu Asp Gly Ile Cys Ile Pro Asn Phe
 210 215 220
 Trp Glu Cys Asp Gly His Pro Asp Cys Leu Tyr Gly Ser Asp Glu His
 225 230 235 240
 Asn Ala Cys Val Pro Lys Thr Cys Pro Ser Ser Tyr Phe His Cys Asp
 245 250 255
 Asn Gly Asn Cys Ile His Arg Ala Trp Leu Cys Asp Arg Asp Asn Asp
 260 265 270
 Cys Gly Asp Met Ser Asp Glu Lys Asp Cys Pro Thr Gln Pro Phe Arg
 275 280 285
 Cys Pro Ser Trp Gln Trp Gln Cys Leu Gly His Asn Ile Cys Val Asn
 290 295 300
 Leu Ser Val Val Cys Asp Gly Ile Phe Asp Cys Pro Asn Gly Thr Asp
 305 310 315 320
 Glu Ser Pro Leu Cys Asn Gly Asn Ser Cys Ser Asp Phe Asn Gly Gly
 325 330 335
 Cys Thr His Glu Cys Val Gln Glu Pro Phe Gly Ala Lys Cys Leu Cys
 340 345 350
 Pro Leu Gly Phe Leu Leu Ala Asn Asp Ser Lys Thr Cys Glu Asp Ile
 355 360 365
 Asp Glu Cys Asp Ile Leu Gly Ser Cys Ser Gln His Cys Tyr Asn Met
 370 375 380
 Arg Gly Ser Phe Arg Cys Ser Cys Asp Thr Gly Tyr Met Leu Glu Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Arg Thr Cys Lys
 405

ES 2 927 217 T3

<210> 13
 <211> 495
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 13
 Glu Arg Cys Gly Ala Ser Ser Phe Thr Cys Ser Asn Gly Arg Cys Ile
 1 5 10 15
 Ser Glu Glu Trp Lys Cys Asp Asn Asp Asn Asp Cys Gly Asp Gly Ser
 20 25 30
 Asp Glu Met Glu Ser Val Cys Ala Leu His Thr Cys Ser Pro Thr Ala
 35 40 45
 Phe Thr Cys Ala Asn Gly Arg Cys Val Gln Tyr Ser Tyr Arg Cys Asp
 50 55 60
 Tyr Tyr Asn Asp Cys Gly Asp Gly Ser Asp Glu Ala Gly Cys Leu Phe
 65 70 75 80
 Arg Asp Cys Asn Ala Thr Thr Glu Phe Met Cys Asn Asn Arg Arg Cys
 85 90 95
 Ile Pro Arg Glu Phe Ile Cys Asn Gly Val Asp Asn Cys His Asp Asn
 100 105 110
 Asn Thr Ser Asp Glu Lys Asn Cys Pro Asp Arg Thr Cys Gln Ser Gly
 115 120 125
 Tyr Thr Lys Cys His Asn Ser Asn Ile Cys Ile Pro Arg Val Tyr Leu
 130 135 140
 Cys Asp Gly Asp Asn Asp Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Asn Pro Thr
 145 150 155 160
 Tyr Cys Thr Thr His Thr Cys Ser Ser Ser Glu Phe Gln Cys Ala Ser
 165 170 175

ES 2 927 217 T3

Gly Arg Cys Ile Pro Gln His Trp Tyr Cys Asp Gln Glu Thr Asp Cys
 180 185 190
 Phe Asp Ala Ser Asp Glu Pro Ala Ser Cys Gly His Ser Glu Arg Thr
 195 200 205
 Cys Leu Ala Asp Glu Phe Lys Cys Asp Gly Gly Arg Cys Ile Pro Ser
 210 215 220
 Glu Trp Ile Cys Asp Gly Asp Asn Asp Cys Gly Asp Met Ser Asp Glu
 225 230 235 240
 Asp Lys Arg His Gln Cys Gln Asn Gln Asn Cys Ser Asp Ser Glu Phe
 245 250 255
 Leu Cys Val Asn Asp Arg Pro Pro Asp Arg Arg Cys Ile Pro Gln Ser
 260 265 270
 Trp Val Cys Asp Gly Asp Val Asp Cys Thr Asp Gly Tyr Asp Glu Asn
 275 280 285
 Gln Asn Cys Thr Arg Arg Thr Cys Ser Glu Asn Glu Phe Thr Cys Gly
 290 295 300
 Tyr Gly Leu Cys Ile Pro Lys Ile Phe Arg Cys Asp Arg His Asn Asp
 305 310 315 320
 Cys Gly Asp Tyr Ser Asp Glu Arg Gly Cys Leu Tyr Gln Thr Cys Gln
 325 330 335
 Gln Asn Gln Phe Thr Cys Gln Asn Gly Arg Cys Ile Ser Lys Thr Phe
 340 345 350
 Val Cys Asp Glu Asp Asn Asp Cys Gly Asp Gly Ser Asp Glu Leu Met
 355 360 365
 His Leu Cys His Thr Pro Glu Pro Thr Cys Pro Pro His Glu Phe Lys
 370 375 380
 Cys Asp Asn Gly Arg Cys Ile Glu Met Met Lys Leu Cys Asn His Leu
 385 390 395 400
 Asp Asp Cys Leu Asp Asn Ser Asp Glu Lys Gly Cys Gly Ile Asn Glu
 405 410 415

ES 2 927 217 T3

Cys His Asp Pro Ser Ile Ser Gly Cys Asp His Asn Cys Thr Asp Thr
 420 425 430

Leu Thr Ser Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Pro Gly Tyr Lys Leu Met Ser
 435 440 445

Asp Lys Arg Thr Cys Val Asp Ile Asp Glu Cys Thr Glu Met Pro Phe
 450 455 460

Val Cys Ser Gln Lys Cys Glu Asn Val Ile Gly Ser Tyr Ile Cys Lys
 465 470 475 480

Cys Ala Pro Gly Tyr Leu Arg Glu Pro Asp Gly Lys Thr Cys Arg
 485 490 495

REIVINDICACIONES

1. Método para medir vitamina D y sus metabolitos en una muestra de líquido corporal de un sujeto, muestra que puede contener proteína de unión a vitamina D endógena (DBP), que comprende las etapas de:
 - a) poner en contacto dicha muestra con megalina y/o un fragmento de la misma en condiciones de unión para formar un complejo ternario que comprende DBP, metabolito de vitamina D y megalina o un fragmento de la misma;
 - b) determinar la cantidad de DBP unida por megalina o un fragmento de la misma; y
 - c) relacionar la cantidad de DBP unida a megalina con el estado de vitamina D de dicho sujeto.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho fragmento de megalina comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:01 a SEQ ID NO:10.
3. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho fragmento de megalina comprende el aminoácido SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 o combinaciones de los mismos.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el fragmento de megalina se une exclusivamente a la proteína de unión a vitamina D (DBP), y a ninguno de los otros ligandos de megalina.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende una determinación del metabolito de vitamina D unido.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende una medición diferencial de 25-hidroxivitamina D₃ en presencia de 25-hidroxivitamina D₂, 24,25-dihidroxivitamina D₂ o 24,25-dihidroxivitamina D₃.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende la adición a la muestra de una cantidad conocida de proteína de unión a vitamina D.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que además pone en contacto dicha muestra con cubilina y/o un fragmento soluble de la misma.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho complejo con DBP se determina mediante inmunoturbidimetría o nefelometría potenciada por partículas.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho complejo con DBP se determina mediante un inmunoensayo seleccionado del grupo ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), RIA (radioinmunoensayo), FIA (inmunoensayo de fluorescencia), LIA (inmunoensayo de luminiscencia) o ILMA.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende las etapas de:
 - (a) proporcionar una cantidad definida de megalina y/o un fragmento soluble de la misma acoplado a una fase sólida;
 - (b) poner en contacto la muestra con la fase sólida que tiene megalina inmovilizada y/o un fragmento soluble de la misma;
 - (c) crear condiciones para permitir la unión de megalina y/o un fragmento soluble de la misma al complejo formado por la proteína de unión a vitamina D (DBP) y los metabolitos de vitamina D, en el que la proteína de unión a vitamina D (DBP) por sí sola no se une a megalina y/o un fragmento soluble de la misma; y lavar la fase sólida;
 - (e) proporcionar un complejo de anticuerpos que reconoce el complejo que comprende DBP, vitamina D o sus metabolitos y megalina o un fragmento soluble de la misma;
 - (f) poner en contacto dicha megalina y/o un fragmento soluble de la misma unido a la proteína de unión a vitamina D (DBP) y metabolitos de vitamina D con el anticuerpo contra la proteína de unión a vitamina D (DBP), e inmovilizar el complejo en la fase sólida; y
 - (g) determinar la cantidad de anticuerpo unido a la fase sólida y cuantificar los metabolitos de vitamina D en suero o plasma sanguíneo por correlación con muestras convencionales.

12. Kit de prueba para su uso en un método para determinar el estado de vitamina D en una muestra de líquido corporal, que comprende un anticuerpo que se une a DBP y un fragmento o secuencia de aminoácidos de megalina, acoplado opcionalmente a un portador.
- 5 13. Composición para medir metabolitos de vitamina D en una muestra de líquido corporal, que comprende anticuerpos contra un epítipo de DBP y/o un fragmento de megalina.

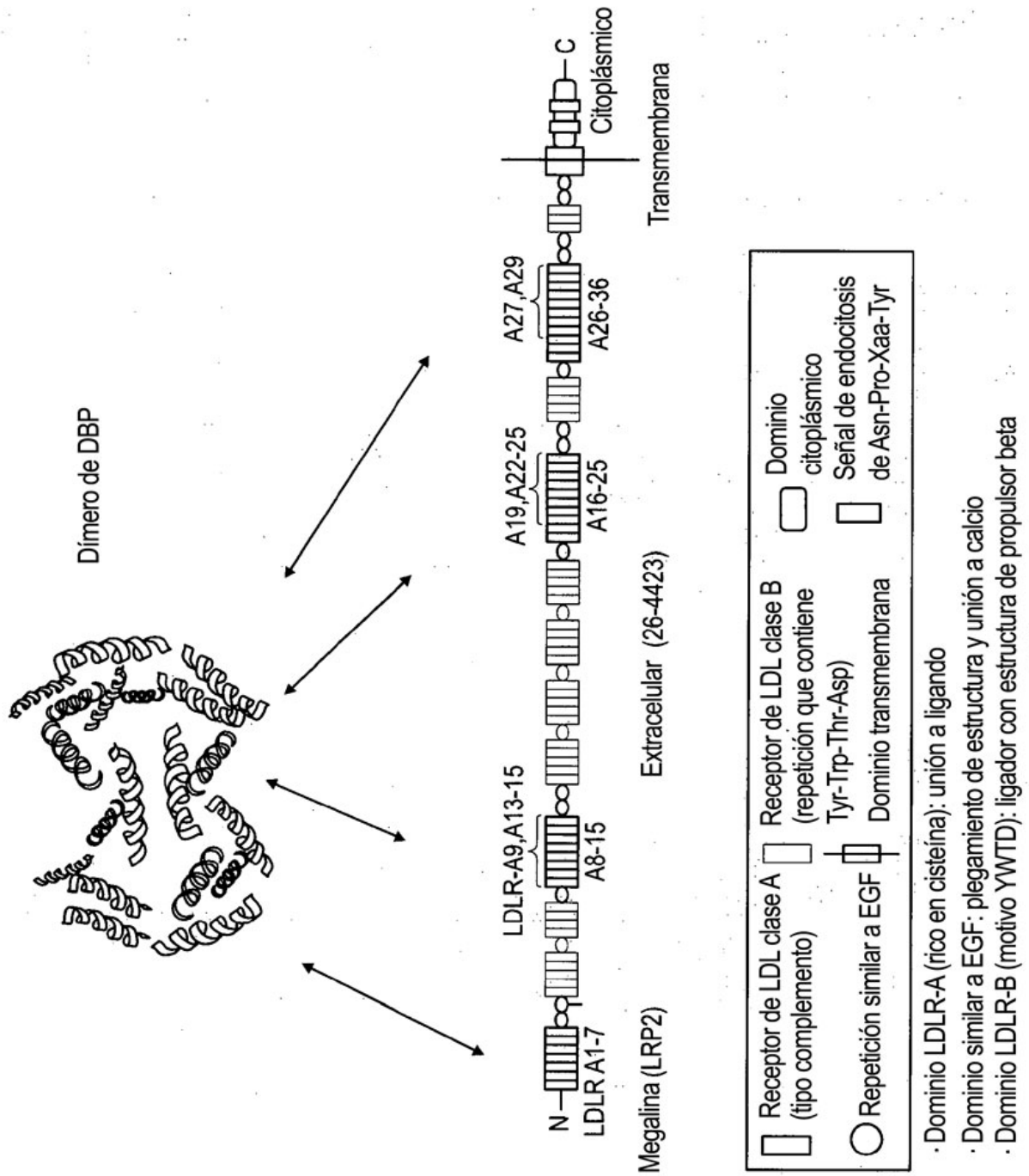


Fig. 1A

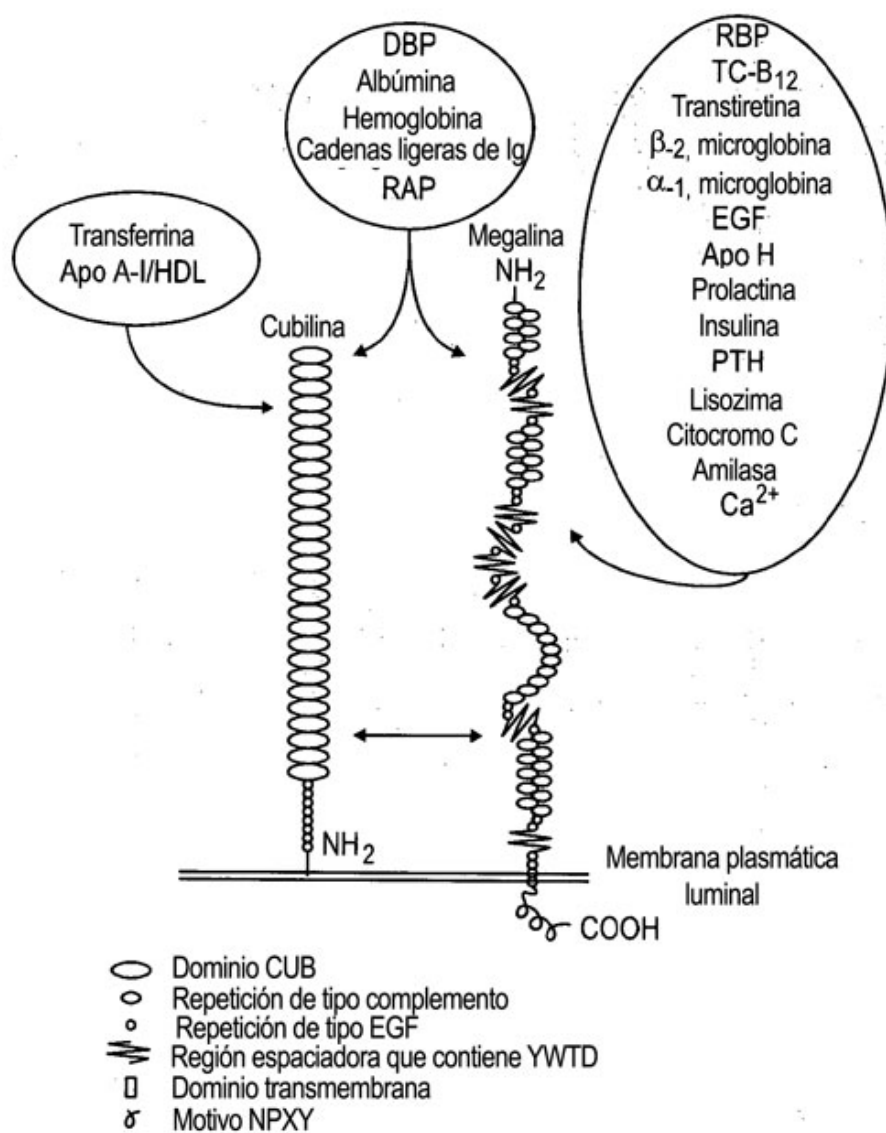


Fig. 1B

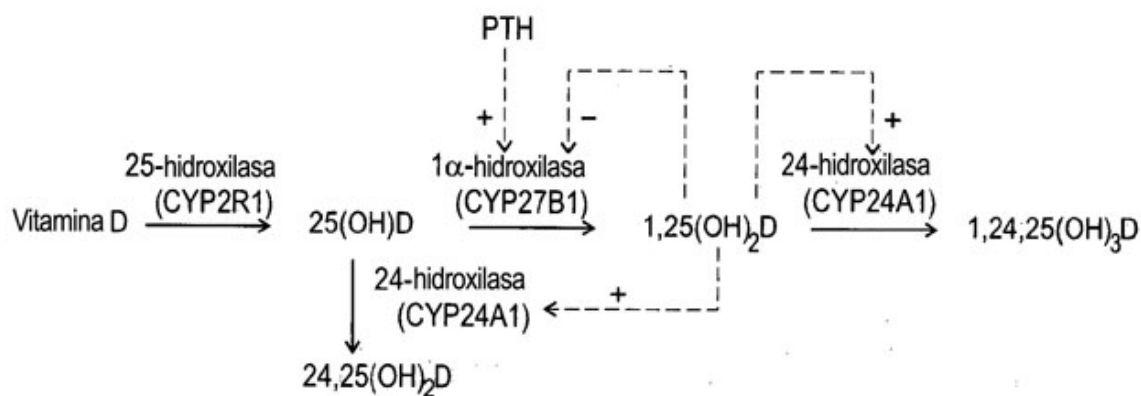


Fig. 1C

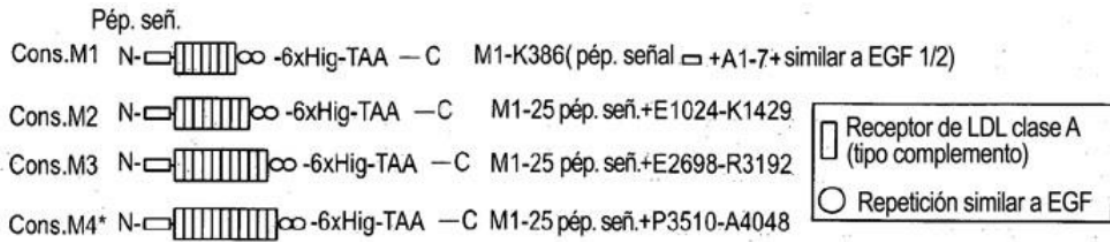


Fig. 2A

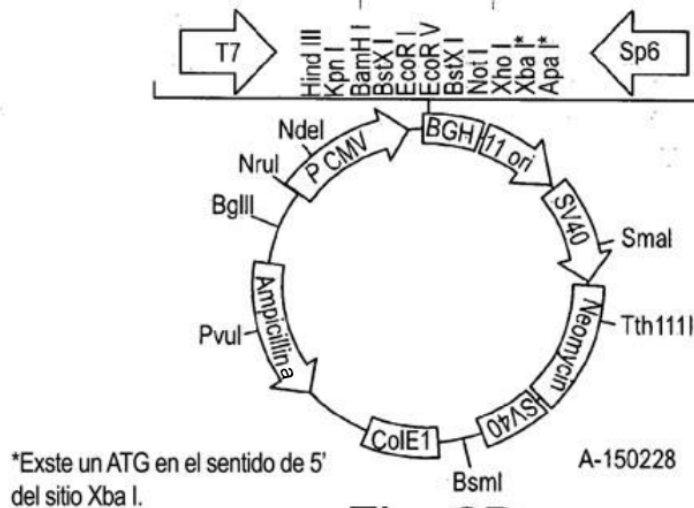
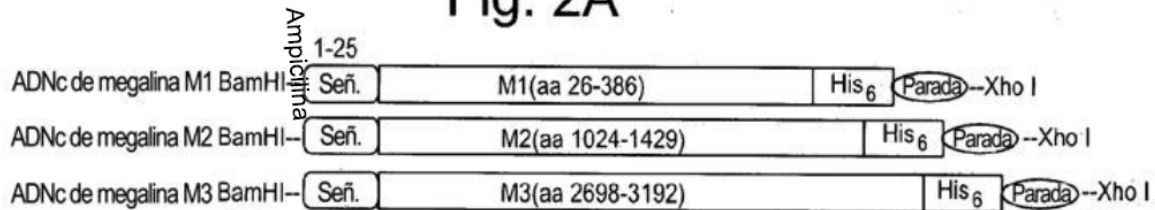


Fig. 2B

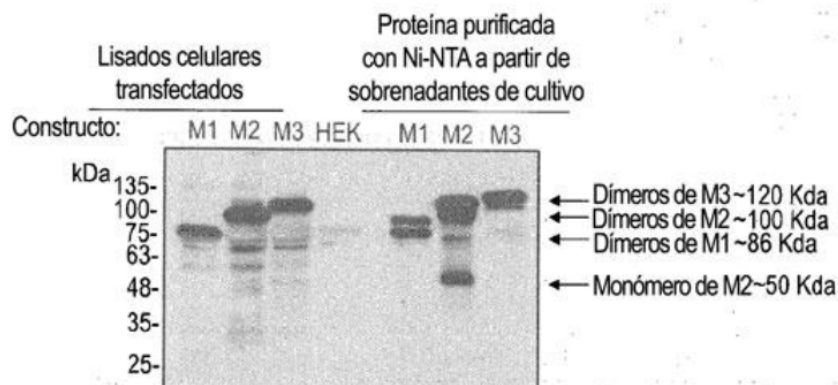


Fig. 2C

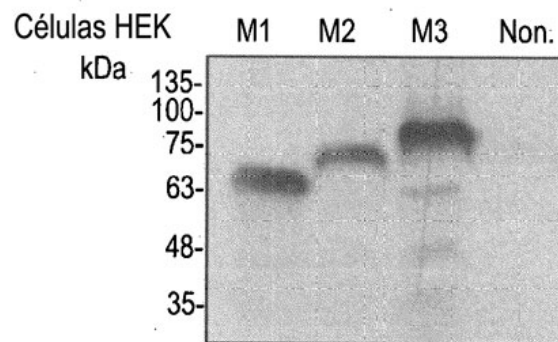


Fig. 3A

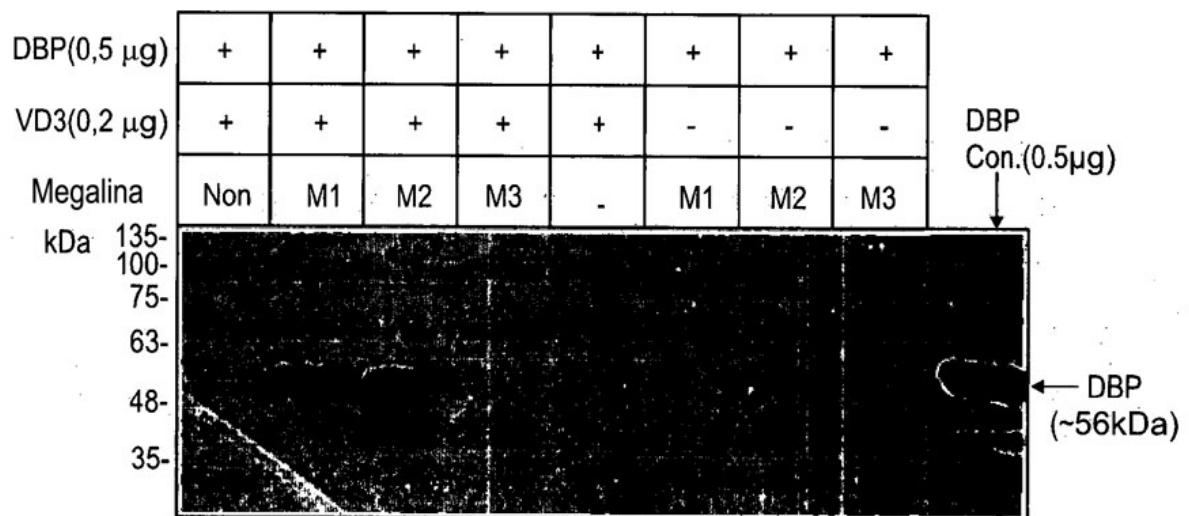


Fig. 3B

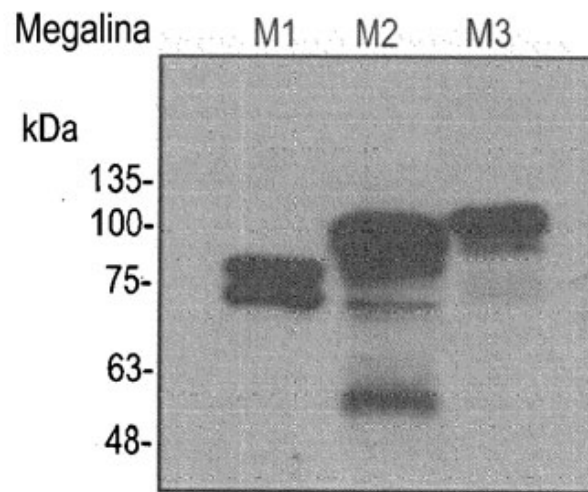


Fig. 4A

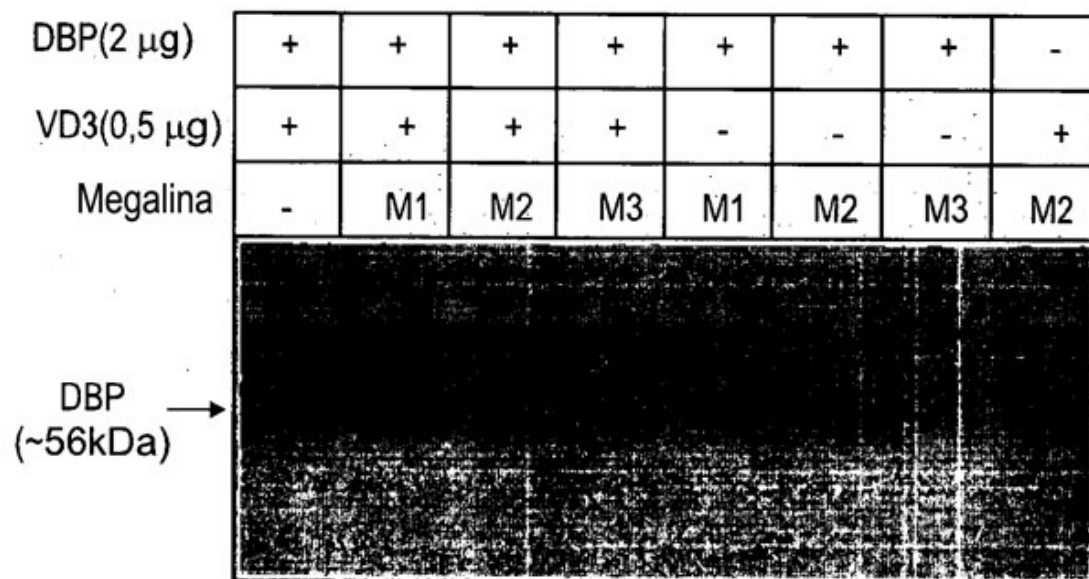


Fig. 4B

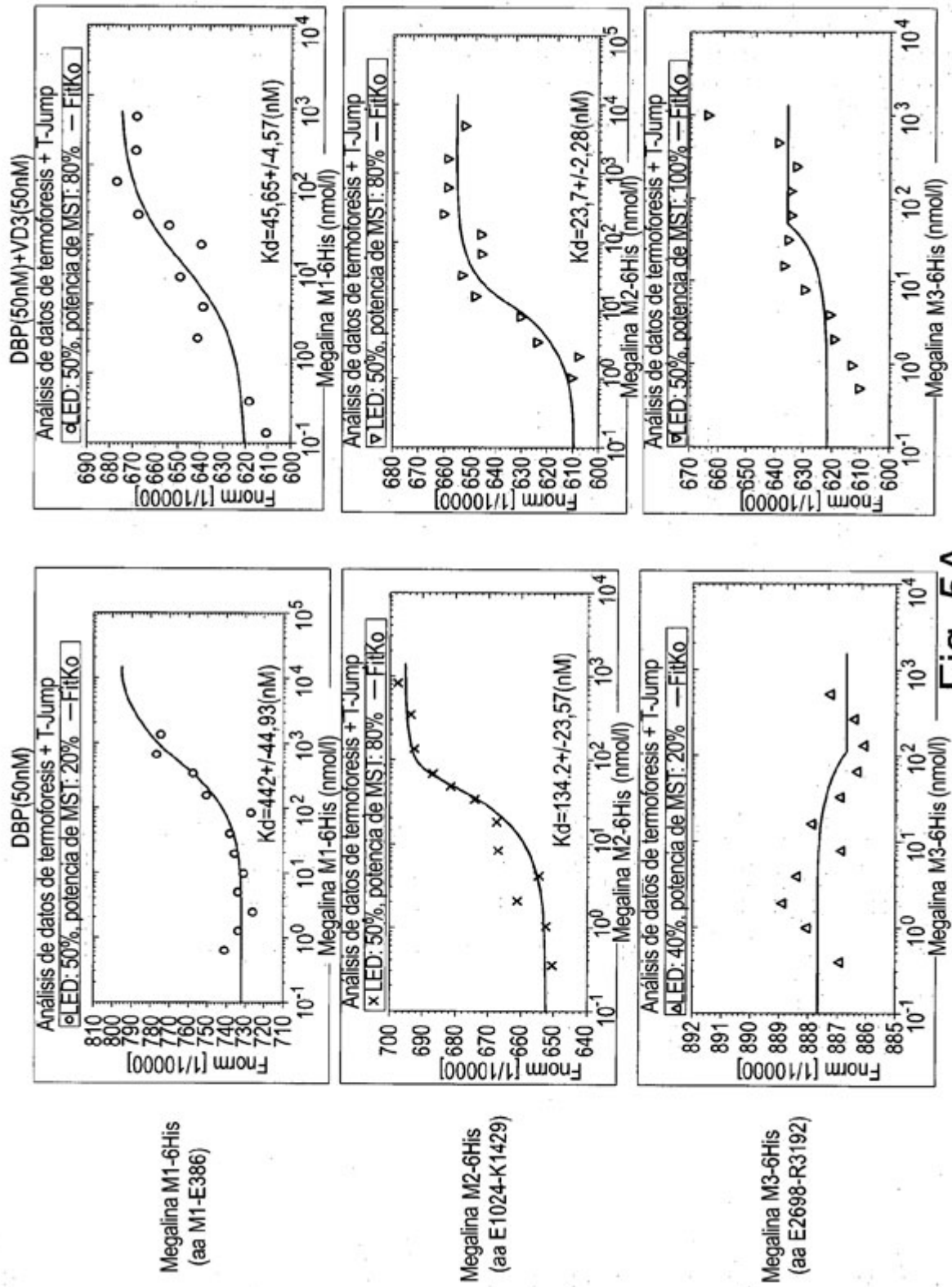


Fig. 5A

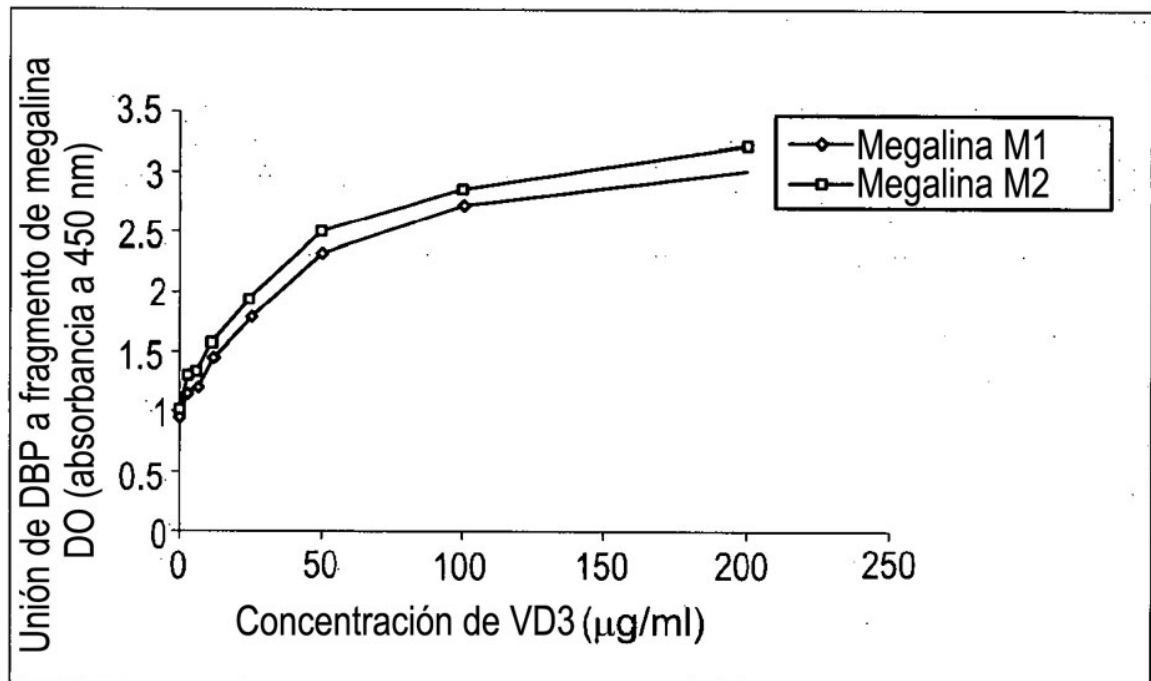


Fig. 5B

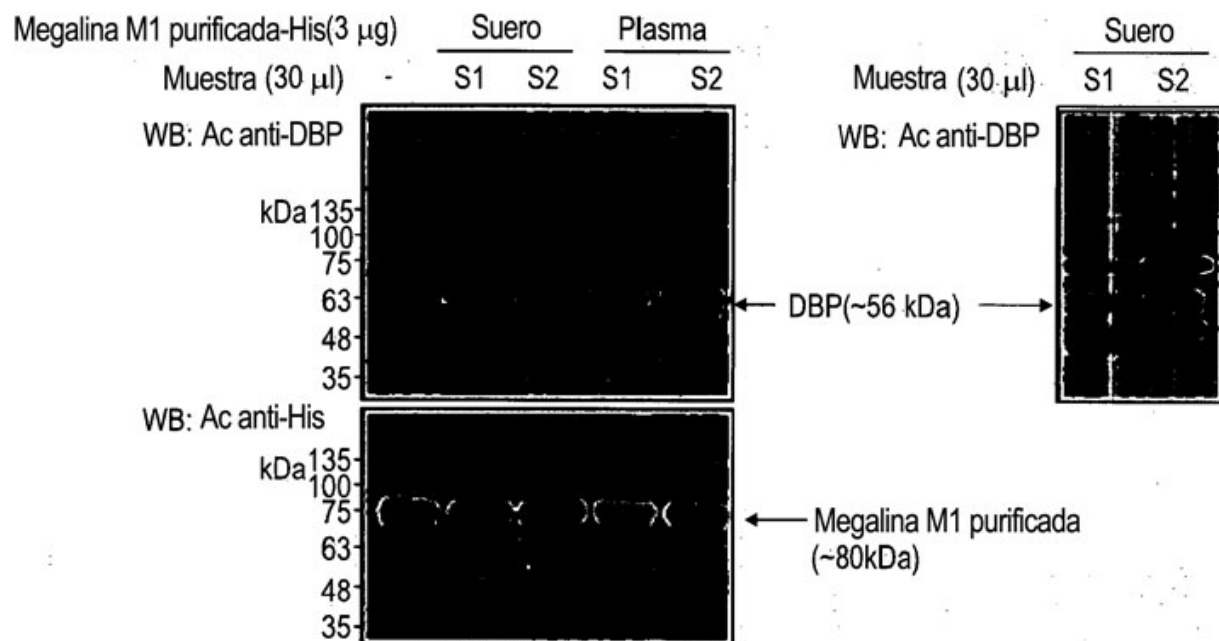


Fig. 6A

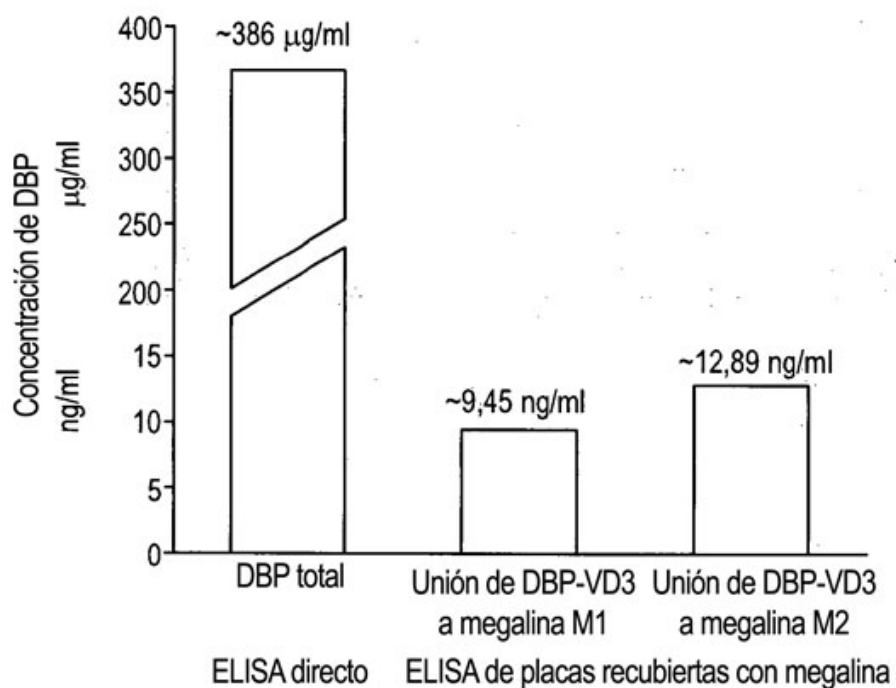


Fig. 6B

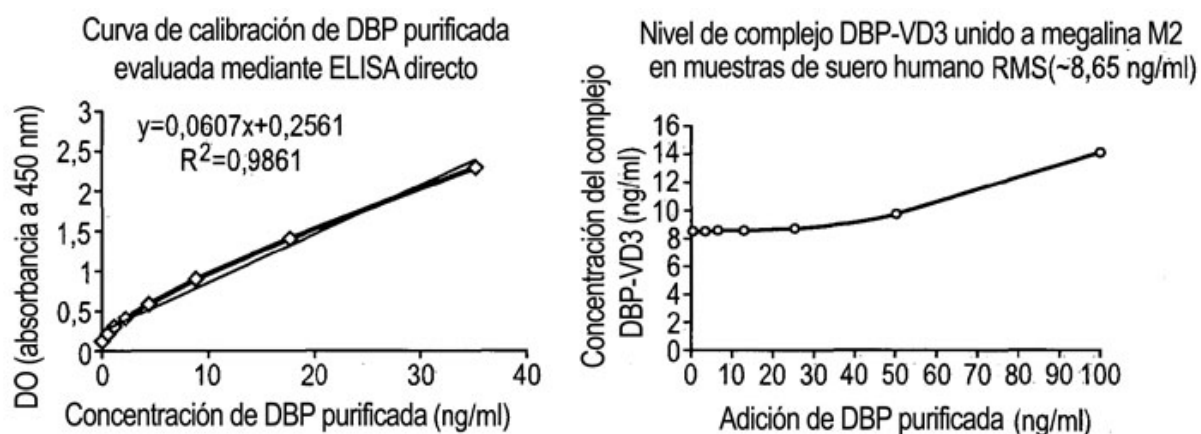


Fig. 7A

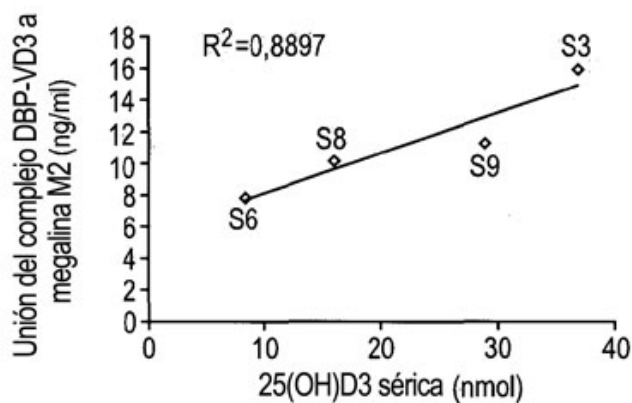


Fig. 7B

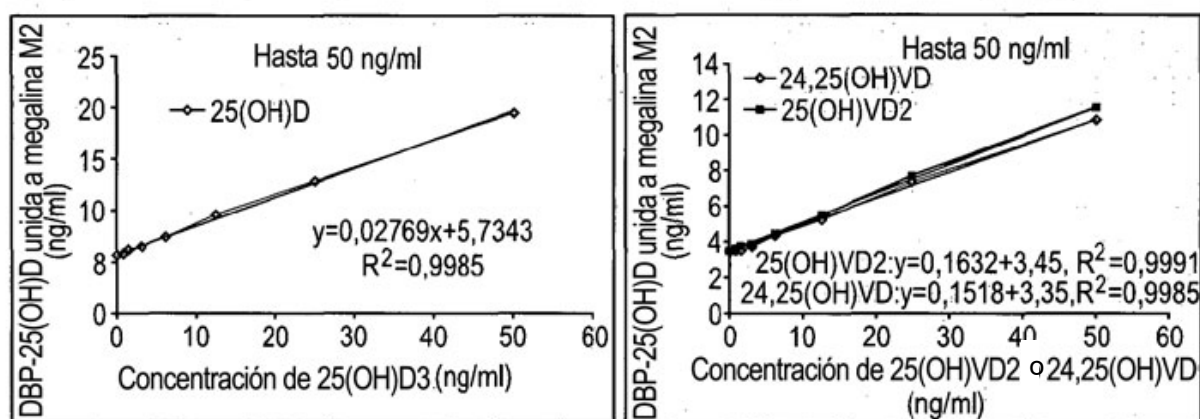


Fig. 7C

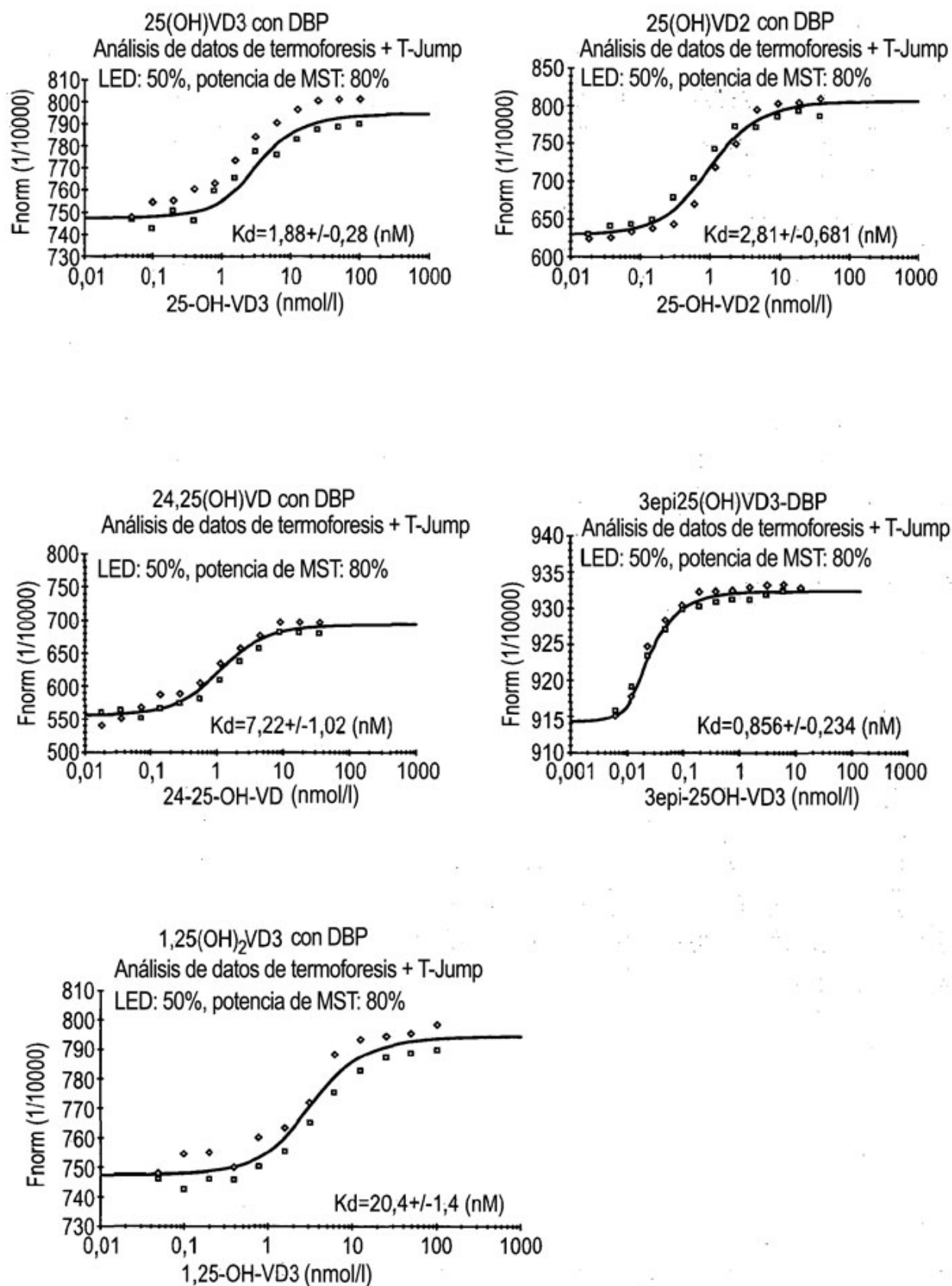


Fig. 8A

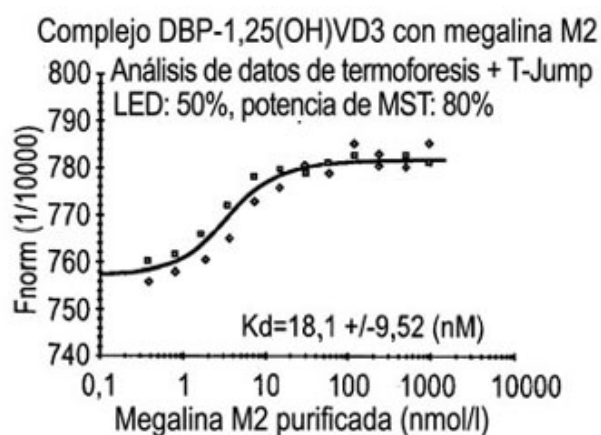
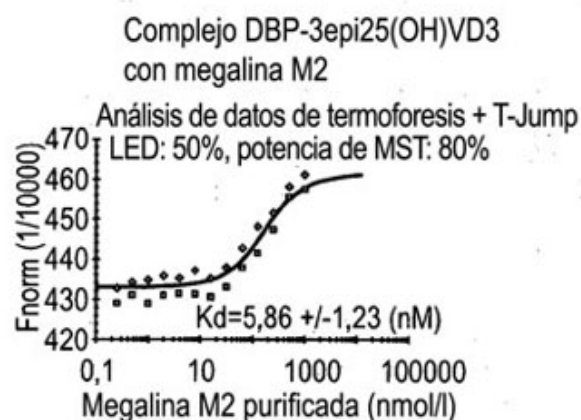
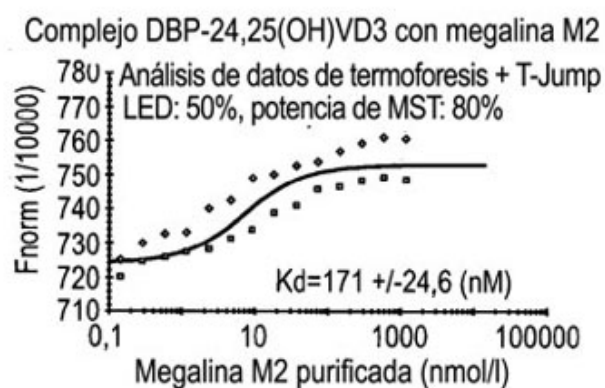
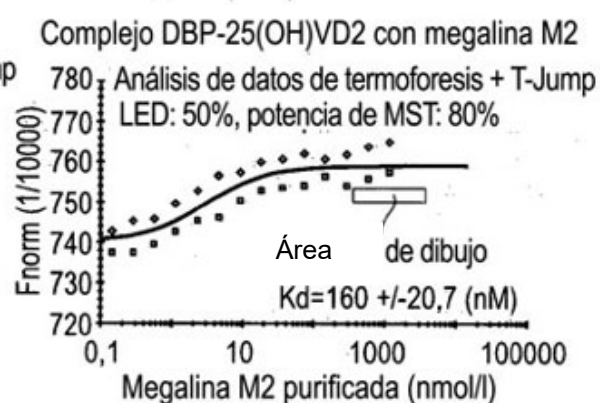
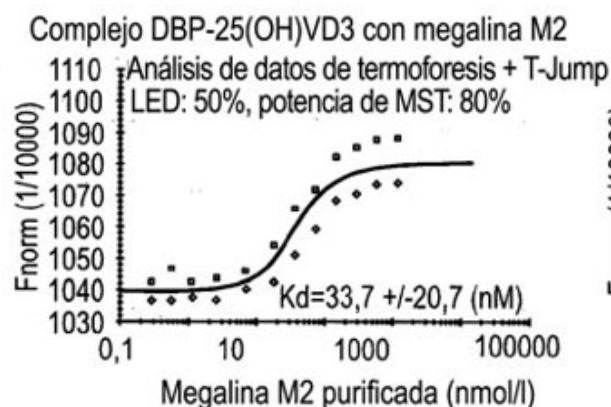


Fig. 8B

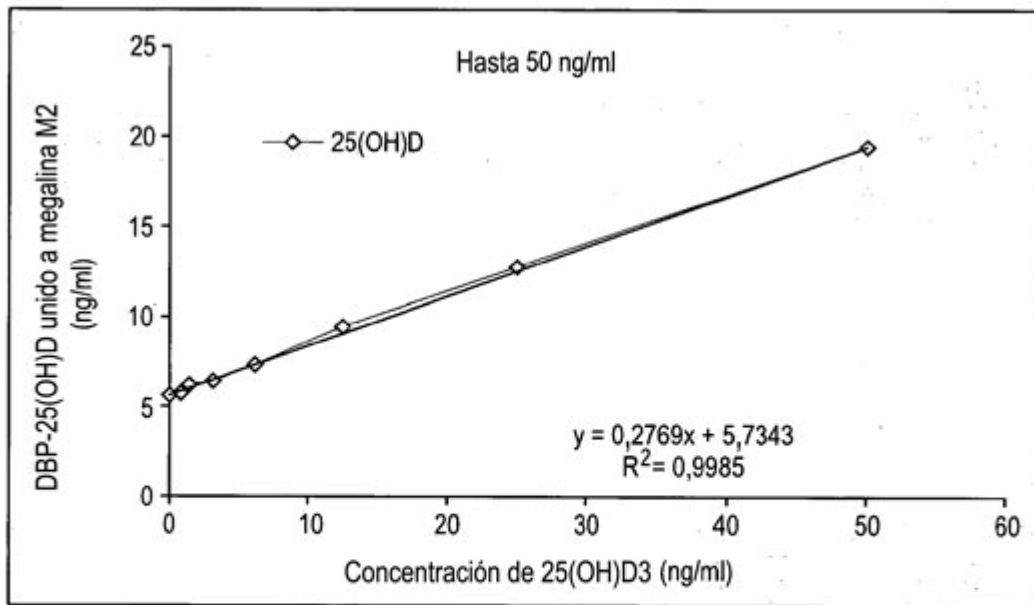


Fig. 9A

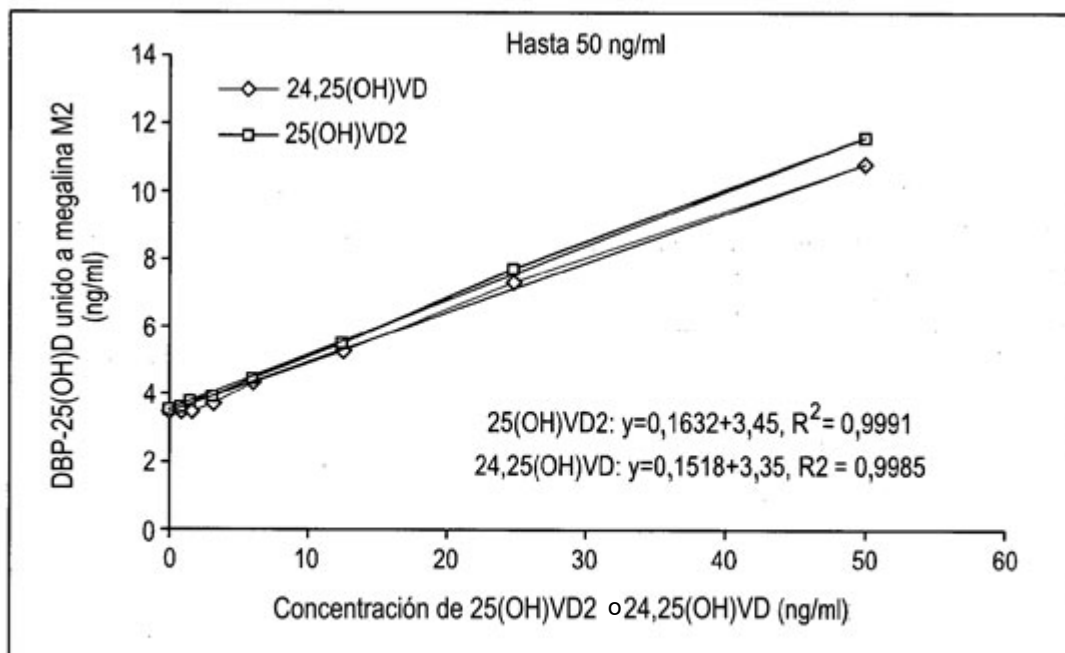


Fig. 9B

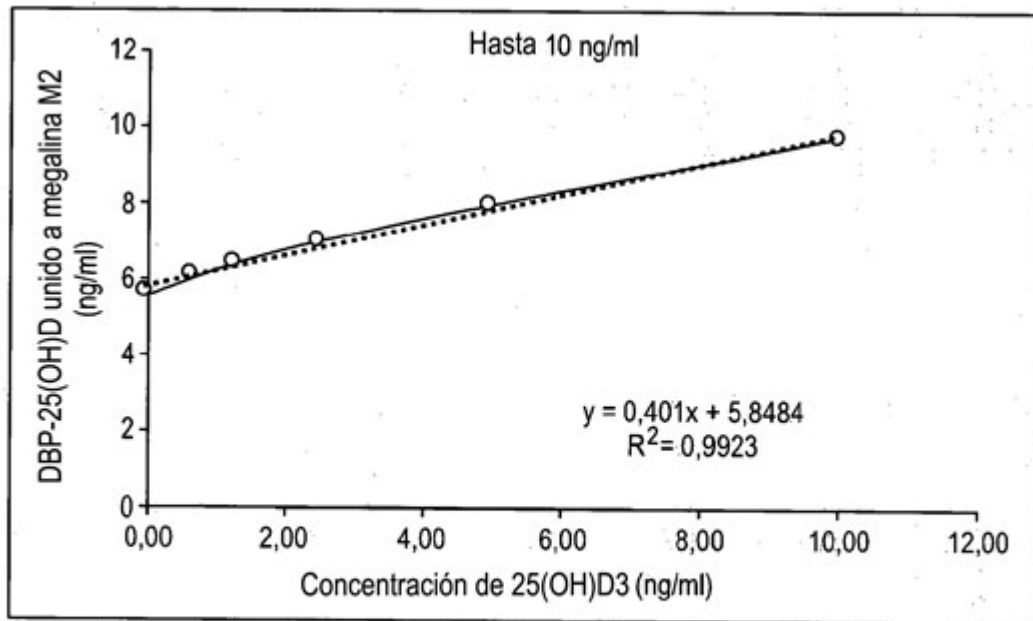


Fig. 10A

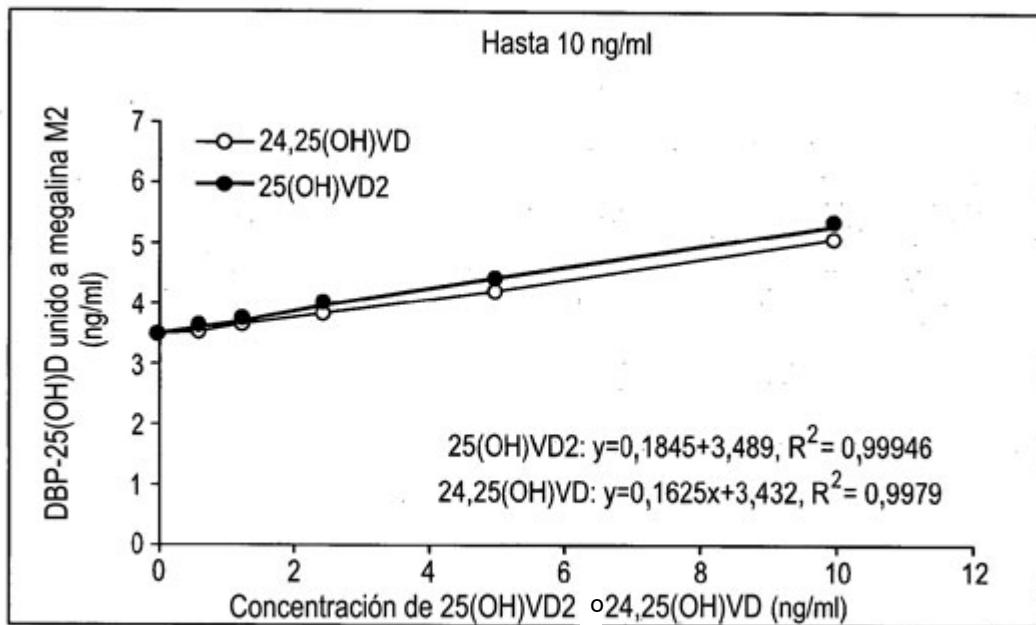


Fig. 10B

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCION

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al recopilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- EP 2126586|B1 [0004]
- WO 9967211 A [0004]
- EP 0753743 A [0004]
- WO 2004063704 A [0004]
- EP 2955516 B1 [0004]
- WO 03023391 A [0004]
- DE 102018100096 [0100]

Literatura no patente citada en la descripción

- CHAPUY MC et al. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, vol. 81, 1129-33 [0002]
- SCHARLA et al. *Exp Clin Endocrinol. Diabetes*, 1996, vol. 104, 289-292 [0002]
- TRIPKOVIC L et al. *Am J Clin Nutr.*, June 2012, vol. 95 (6), 1357-1364 [0002]
- *Am J Clin Nutr.*, August 2017, vol. 106 (2), 481-490 [0002]
- HAMASHIMA et al. *Clinica Chimica Acta*, 2002, vol. 321, 23-28 [0003]
- The Importance of 25-Hydroxyvitamin D Assay Standardization and the Vitamin D Standardization Program. *J AOAC Int.*, 2017, vol. 100 (5), 1223-1224 [0004]
- MALMSTROEM S et al. *J AOAC Int.*, 2017, vol. 100 (5), 1323-7 [0004]
- HYUN-JEONG KIM et al. Clinical Utility of Measurement of Vitamin D-Binding Protein and Calculation of Bioavailable Vitamin D in Assessment of vitamin D Status. *Ann Lab Med*, 2017, vol. 37, 34-38 [0004]
- NYKJAER A et al. An endocytic pathway essential for the renal uptake and activation of the steroid 25-(OH)-vitamin D3. *Cell*, 1999, vol. 96, 507-515 [0004]
- NYKJAER A et al. Cubilin dysfunction causes abnormal metabolism of the steroid hormone 25(OH) vitamin D. *PNAS U.S.A.*, 2001, vol. 98 (24), 13895-900 [0008]
- TRABUCO LG et al. PepSite: prediction of peptide-binding sites from protein surfaces. *Nucleic Acids Res.*, 2012 [0019]
- FARQUHARM G et al. *Soc. Nephrol.*, vol. 6 (1), 35-47 [0038]
- NYKJAER et al. Cubilin dysfunction causes abnormal metabolism of the steroid hormone 25(OH) vitamin D. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 20 November 2001, vol. 98 (24), 13895-13900 [0043]