



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 348 126**

51 Int. Cl.:
G01N 33/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08708477 .8**

96 Fecha de presentación : **30.01.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2126586**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.12.2009**

54 Título: **Determinación directa de la vitamina D en suero o plasma.**

30 Prioridad: **01.02.2007 DE 10 2007 005 099**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.11.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.11.2010

73 Titular/es: **Immundiagnostik AG.**
Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, DE

72 Inventor/es: **Roth, Heinz-Juergen;**
Armbruster, Franz Paul;
Fiedl, Sabine y
Schumann, Claudia

74 Agente: **Roeb Díaz-Álvarez, María**

ES 2 348 126 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

Determinación directa de la vitamina D en suero o plasma.

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un procedimiento para la determinación cuantitativa de la vitamina D en suero o plasma.

Antecedentes de la invención

10 Los seres humanos pueden formar vitamina D₃ (colecalfiferol) en la piel con la ayuda de la luz solar. La vitamina D₂ (ergocalciferol) se ingiere con la comida. A pesar de que las vitaminas D₂ y D₃ difieren ligeramente en sus cadenas laterales, tienen una actividad biológica idéntica. En circulación ambas se unen a la proteína de unión a la vitamina D (VDBP) y se metabolizan en el hígado a 25-hidroxivitamina D. La 25-hidroxivitamina D es la forma de almace-
 15 namiento en el cuerpo y el metabolito de la vitamina D con la concentración más alta en suero o plasma. Cuando es necesaria, se hidroxila en el riñón a 1 α ,25-hidroxivitamina D (la denominada hormona D) que es la forma biológicamente activa y que regula la absorción de calcio en el intestino, la mineralización de los huesos, la diferenciación de los osteoplastos, la síntesis de la matriz ósea y, entre otras, también las funciones neuromusculares. Incluso una pequeña deficiencia de menos de 15 ng de 25-hidroxivitamina D por ml de suero (37,5 nmol/l de 25-OH-Vit.D/I) provoca un
 20 incremento del nivel de parathormona y un incremento de la resorción ósea, debido a la reducción de la absorción de calcio (Chapuy MC y col. en J Clin Endocrinol Metab 1996; 81: 1129-33). La deficiencia en vitamina D es un factor de riesgo importante en la osteoporosis senil. Un diagnóstico temprano y el suplemento de vitamina D₂ permiten una prevención eficaz de las fracturas óseas. Una deficiencia severa de vitamina D de menos de 5 ng de 25-hidroxivitamina D por ml de suero (12,5 nmol/l de 25-OH-Vit.D/I) provoca raquitismo en niños y osteomalacia en adultos (Scharla
 25 y col. Exp Clin Endocrinol. Diabetes, 1996, 104:289-292). El exceso de vitamina D debido a una sobredosificación provoca hipercalcemia. Durante el invierno, en Alemania aproximadamente un tercio de la población mayor de 50 años sufre de deficiencia en vitamina D debido a la falta de luz (Scharla y col., Osteoporose Int. 1998; 8 (Supplement 2):S7-S12). La gente más joven también puede sufrir de deficiencia en vitamina D, debido a enfermedades gastroin-
 30 testinales, disfunción hepática, una mala adsorción, o un metabolismo acelerado inducido por fármacos, por ejemplo, provocado por antiepilépticos.

Las técnicas de laboratorio convencionales para la determinación de la 25-hidroxivitamina D en suero y plasma son muy laboriosas (Tanner y col. (1988), J. Assoc. of Analyt. Chem., 17, 607-710). Además, la patente de EE.UU. 5.981.779 (Holick y col.), el documento WO 89/01631 y la EP 0 583 945 (DeLuca y col.) enseñan una prueba para
 35 vitamina D basada en la unión a la VDBP. Para conseguir eso, en primer lugar se deben extraer los metabolitos de la vitamina D del plasma o suero usando disolventes orgánicos, y a continuación se deben purificar por cromatografía. El documento WO 99/67211 (Armbruster y col.) enseña la preparación de una muestra que supone la precipitación de las proteínas plasmáticas y séricas con etanol. A continuación el precipitado de proteínas se extrae por centrifugación y el sobrenadante etanólico, que comprende los metabolitos solubles de la vitamina D, se usa en el ensayo de unión.
 40 El documento EP 0 753 743 (Hollis) enseña la preparación de la muestra de plasma o suero usando precipitación con peryodato. A continuación se lleva a cabo la cuantificación de los compuestos de vitamina D en el sobrenadante exento de proteínas. El documento WO 2004/063704 (Diasorin Inc.) describe un procedimiento de ensayo de una muestra de sangre o suero para la determinación de la presencia de 25-hidroxivitamina D que comprende una reducción del pH de la muestra a 5,5 o inferior para disociar la 25-hidroxivitamina D de las proteínas de unión a vitamina D. Las
 45 proteínas de unión a vitamina D no se eliminan antes de la cuantificación de los metabolitos de la vitamina D en la muestra. El documento WO 02/46746 (Immunodiagnostic Systems Ltd.) se refiere a un procedimiento para medir la 25-hidroxivitamina D en el que se añade un agente de desplazamiento no competitivo, tal como la warfarina, para llevar a cabo la separación del analito en la muestra de las proteínas de unión a vitamina D. La cuantificación de los metabolitos de la vitamina D en la muestra se lleva a cabo en presencia de proteínas de unión a vitamina D y del agente
 50 de desplazamiento añadido. Los documentos WO 03/023391 (Immundiagnostik AG) y DE 10144 905 (Armbruster y col.) describen un procedimiento para la determinación de la vitamina D directamente en plasma o suero en el que se añade un compuesto salicílico soluble al suero o plasma para liberar la 25-hidroxivitamina D de la VDBP. A continuación se determina directamente la cantidad de 25-hidroxivitamina D en plasma o suero usando anticuerpos.

55 Los procedimientos de preparación de muestras mencionados anteriormente son laboriosos o tienden a generar errores, o ambos. Es el objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento simple y fiable para la determinación cuantitativa directa de la 25-hidroxivitamina D en suero o plasma.

Breve descripción de la invención

60 Este problema se ha resuelto mediante el procedimiento según la reivindicación 1. Las formas de realización preferidas del procedimiento se describen en las reivindicaciones dependientes.

Según la presente invención, el procedimiento directo para la determinación cuantitativa de los metabolitos de la
 65 vitamina D en plasma o suero sanguíneos por análisis de unión competitiva, sin la necesidad de la purificación de los metabolitos de la vitamina D del plasma o suero sanguíneos, incluye las siguientes etapas: (a) adición de una cantidad apropiada de una serina proteasa con actividad endo y exoproteolítica tal como la proteinasa K a una muestra que contiene plasma o suero sanguíneos y la digestión de las proteínas de unión a vitamina D en el plasma o suero sanguíneos,

hasta que ya no se puedan unir más metabolitos de la vitamina D; (b) dilución de la muestra que contiene la serina proteasa, los metabolitos de la vitamina D y las proteínas plasmáticas o séricas digeridas usando un tampón de dilución, en el que la serina proteasa es sustancialmente inactiva; (c) proporción de una composición trazadora de la vitamina D, que está acoplada a una fase sólida; (d) proporción de un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo monoclonal contra los metabolitos pertinentes de la vitamina D, en el que dicho anticuerpo es sustancialmente resistente a la actividad endoproteolítica de la serina proteasa usada, y (e) combinación de la muestra con los metabolitos de la vitamina D (analito), la fase sólida con el compuesto trazador de la vitamina D y el anticuerpo monoclonal durante un periodo predeterminado, y la realización durante un periodo de tiempo determinado de una reacción de unión competitiva del metabolito de la vitamina D y el trazador de la vitamina D sobre el anticuerpo monoclonal en un tampón de unión, en el que la serina proteasa es esencialmente inactiva y no se puede producir una unión inespecífica entre la vitamina D y las proteínas séricas remanentes, y (f) la separación de la fase sólida con el compuesto trazador de la vitamina D y del anticuerpo monoclonal opcionalmente unido del tampón de unión, y opcionalmente, el lavado de la fase sólida; y (g) determinación de la cantidad de anticuerpo monoclonal sobre la fase sólida, y (h) determinación de la cantidad de metabolito de la vitamina D en el plasma o suero sanguíneos usando datos comparativos.

En una realización preferida del procedimiento, el análisis de unión se lleva a cabo a un valor de pH entre 3,0 y 10,0 en presencia del 0,1 al 5,0% (p/v) de gelatina, 1 a 10 mmol/l de EDTA o EGTA, y opcionalmente inhibidores de la serina proteasa, y del 0,005 al 0,050% (p/v) de β -mercaptoetanol. El anticuerpo usado en las etapas (d) y (f) también puede ser una mezcla de anticuerpos monoclonales, que se unen específicamente a la 25-hidroxivitamina D₃ y 25-hidroxivitamina D₂, respectivamente. En una realización de la invención, el anticuerpo monoclonal se puede unir a la 25-hidroxivitamina D₃ o a la 25-hidroxivitamina D₂ o a ambas. En una realización diferente del procedimiento de la invención, el anticuerpo monoclonal se puede unir a la 1 α ,25-dihidroxivitamina D₂ o a la 1 α ,25-dihidroxivitamina D₃ o a ambos metabolitos de la dihidroxivitamina D.

El metabolito de la vitamina D determinado mediante el procedimiento según la invención se selecciona entre 25-hidroxivitamina D₂, 25-hidroxivitamina D₃, 1 α ,25-dihidroxivitamina D₂, y 1 α ,25-dihidroxivitamina D₃. El análisis de unión de proteínas y la posterior determinación cuantitativa preferentemente se llevan a cabo en un ELISA (ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas), RIA (radioinmunoensayo), FIA (inmunoensayo de fluorescencia), LIA (inmunoensayo de luminiscencia), ILMA (ensayo inmunoluminométrico) o ECLA (ensayo de luminiscencia electroquímico). La cantidad de anticuerpo monoclonal unido preferentemente se determina usando un segundo anticuerpo. Normalmente el segundo anticuerpo es, por tanto, de una especie diferente. El anticuerpo monoclonal para el análisis de unión también puede estar acoplado a un marcador de color, enzimático, de fluorescencia, de luminiscencia, de quimioluminiscencia (por ejemplo, acridina) o electroluminiscencia (por ejemplo, complejo de rutenio) cuantificables.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un kit de prueba para llevar a cabo el procedimiento anteriormente mencionado, que incluye uno o más anticuerpos específicos para los metabolitos de la vitamina D, un trazador de la vitamina D acoplado a una fase sólida, la proteinasa K, y disoluciones tampón apropiadas. Las disoluciones tampón preferidas en el kit de prueba de la invención comprenden un tampón de digestión con agentes desnaturalizantes y que despliegan las proteínas de unión a la vitamina D, que entonces son digeridas y destruidas por una serina proteasa tal como la proteinasa K, un tampón de ensayo, que comprende preferentemente una sustancia que inhibe la proteinasa K y un agente que libera un grupo salicílico, preferentemente ácido salicílico en una cantidad entre 0,1 y 1,0 mol/l, para evitar una nueva unión inespecífica de la vitamina D a proteínas séricas parcialmente digeridas.

Como se ha mencionado anteriormente, en el procedimiento de la invención, la muestra de plasma o suero se trata antes del análisis con proteinasa K, de tal forma que todas las proteínas plasmáticas o séricas que se puedan unir a los metabolitos de la vitamina D son digeridas y cortadas, de manera que ya no se puedan unir de ninguna forma a la 25-hidroxivitamina D o a cualquier otro metabolito de la vitamina D. Esto se consigue preferentemente mediante la digestión con proteinasa K, lo más preferentemente en presencia de agentes desnaturalizantes de proteínas y agentes de liberación de vitamina D de manera que las proteínas de unión a vitamina D son desplegadas y resultan digeridas por la proteasa. Después de eso, se diluye una alícuota del suero o plasma tratados con la proteinasa K en una disolución tampón que inhibe y detiene la actividad de la proteinasa K y que evita una unión inespecífica o específica de metabolitos de la vitamina D a las proteínas séricas remanentes, y se determina rápidamente la cantidad en la muestra del metabolito de la vitamina D deseado usando análisis de unión por competición sobre anticuerpos, preferentemente anticuerpos monoclonales que son sustancialmente resistentes a la proteinasa K. Como se ha mencionado anteriormente, se puede asegurar una digestión completa de las proteínas de unión a vitamina D mediante la adición de agentes desnaturalizantes antes de la digestión con una serina proteasa. Los agentes desnaturalizantes de proteínas útiles son SDS (0,1%), detergentes, y agentes de liberación de vitamina D tales como agentes desnaturalizantes ácidos como ácido salicílico, warfarina, ácidos sulfónicos, ácidos toluensulfónicos, ácido naftalensulfónico, ácidos anilinaftalensulfónicos (ANS), de manera notable el ácido 1-anilinaftalen-8-sulfónico (1,8-ANS) y el ácido 8-anilinaftalen-1-sulfónico (8-ANS), ácidos salicílicos y sus derivados, preferentemente en una concentración eficaz de 0,01 a 20 mg/ml, más preferentemente de 0,1 a 10 mg/ml, lo más preferentemente en cantidades no inferiores a 0,5 mg/ml de suero. Las cantidades y tipos de agentes desnaturalizantes se deben elegir y seleccionar individualmente para cada proteasa sérica.

Comparado con procedimientos anteriores, el procedimiento según la invención tiene la ventaja de que las proteínas de unión a vitamina D no pueden interferir con la medición después de su digestión. Nótese que, aparte de las VDBP, se pueden unir muchas otras proteínas a la vitamina D, por ejemplo, la albúmina, fetoproteína, etc., y que estas proteínas son abundantes en el suero. A pesar de que estas proteínas se separan en gran parte de los metabolitos de la vitamina D en la precipitación convencional usando etanol o peryodato según procedimientos conocidos, puede permanecer

alguna cantidad remanente en la muestra y cuando se cambia el tampón se puede renaturalizar durante el ensayo de unión por competición, y entonces puede interferir con el análisis de unión. La cantidad de proteína remanente también se puede unir a la pared de los vasos de precipitados, o a la fase sólida, y, dependiendo de qué tipo se use, incluso al trazador de la vitamina D, lo cual falsea gravemente las mediciones. El uso de agentes de desplazamiento de la vitamina D tales como los compuestos salicílicos o la warfarina en tampones de liberación o de unión no resuelve este problema fundamental.

El problema se resuelve fundamentalmente con el tratamiento del suero o plasma sanguíneos con proteinasa K. En primer lugar, ese tratamiento enzimático de la proteína plasmática y sérica es un procedimiento establecido, que es fácil de controlar, y no existe el riesgo de precipitación inesperada. En segundo lugar, al contrario de lo que ocurre en una precipitación desnaturante, las proteínas no se pueden volver a renaturalizar después de la digestión, ni siquiera después de cambiar el medio o el tampón. Tercero, la digestión se puede extender a voluntad, hasta que los resultados de la medición se hayan estabilizado, o se puede intensificar o complementar con la adición de agentes desnaturantes y agentes de liberación de vitamina D. Cuarto, la digestión usando proteinasa K se puede automatizar fácilmente, a diferencia de la precipitación de proteínas. Por tanto, el único problema restante es asegurarse de que el análisis de unión por competición no es alterado por la presencia de proteinasa K. Según la invención, este problema se soluciona con un cambio de las condiciones de pH, la dilución de la proteinasa K en un tampón que contiene gelatina y, de manera más genérica, variando las condiciones de manera que inhiban la actividad de la proteinasa K. La actividad de la proteinasa K se puede inhibir adicionalmente con la adición de EGTA.

El EGTA es el compuesto químico ácido etilenglicoltetraacético, un agente quelante que está relacionado con el compuesto EDTA, más conocido, pero con una afinidad por el calcio mucho mayor que por los iones magnesio. Es útil para preparar disoluciones tampón que se asemejen al entorno en el interior de células vivas, en las que normalmente los iones calcio están al menos 1000 veces menos concentrados que los iones magnesio. El pKa para la unión de iones calcio por el EGTA tetrabásico es de 11,00 y el EGTA es, además, un inhibidor de la proteinasa K. Adicionalmente, el ensayo de unión por competición según la presente invención se caracteriza por el uso de compañeros de unión que son sustancialmente resistentes a la proteinasa K. El análisis de unión por competición según la invención además implica múltiples lavados que diluyen y arrastran rápidamente del sistema de ensayo las proteínas no unidas tales como la proteinasa K. Se deben evitar cantidades remanentes de proteinasa K sobre la pared del vaso de precipitados o en fase sólida, y en ese caso no interferirán con el análisis de unión o la determinación de la cantidad de anticuerpos unidos.

Ventajas, características y formas de realización adicionales de la invención se describen en la descripción detallada de la invención, en los ejemplos y en los dibujos.

35 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una representación gráfica de la correlación entre los valores de la 25-hidroxivitamina D sérica medidos directamente determinados mediante ELISA (digestión con proteinasa K durante 1 hora a 37°C) de acuerdo con el Ejemplo 1 de la invención, y los valores determinados mediante ELISA haciendo uso de un reactivo de disociación de ácido salicílico convencional.

La Figura 2 muestra una representación gráfica de la correlación entre los valores de la 25-hidroxivitamina D sérica medidos directamente determinados mediante ELISA (digestión con proteinasa K durante 1 hora a 37°C) de acuerdo con el Ejemplo 1 de la invención y según se determina mediante ELISA de 25-hidroxivitamina D de Immunodiagnostic Systems Limited (IDS) Limited, RU, que hace uso de un tampón de liberación y disociación privado de IDS que contiene warfarina.

La Figura 3 muestra una tabla de correlación de dos procedimientos de referencia analíticos establecidos distintos para medir la vitamina D, que son la medición por LC-MS/MS y HPLC.

La Figura 4 muestra una gráfica de Bland y Altman que representa la diferencia relativa entre los valores de suero directos obtenidos mediante el procedimiento de IDS y el procedimiento de referencia por LC-MS/MS según el Ejemplo 5.

La Figura 5 muestra un diagrama de cajas y bigotes de las mediciones obtenidas mediante el procedimiento según la invención y las mediciones de referencia por HPLC, según el Ejemplo 5.

La Figura 6 muestra una gráfica de correlación de las mediciones obtenidas mediante el procedimiento según la invención y las mediciones de referencia por HPLC, según el Ejemplo 5.

La Figura 7 muestra una gráfica de Bland y Altman que representa la diferencia en porcentaje entre las mediciones obtenidas mediante el procedimiento de la invención comparadas con las mediciones medias obtenidas según el Ejemplo 5.

La Figura 8 muestra una gráfica de cajas y bigotes que compara los valores séricos de vitamina D obtenidos mediante el procedimiento proteolítico directo según la invención (ID EIA), un procedimiento de disociación directo (IDS RIA) y tres procedimientos comerciales indirectos (Roche, DiaSorin RIA y DiaSorin LIA) y los valores séricos obtenidos mediante la HPLC de referencia.

Descripción detallada de la invención

La proteinasa K es una serina proteasa de tipo subtilisina muy activa procedente del hongo *Tritirachium album* con una masa de 28.904 Da (Roelcke, D. y Uhlenbruck, G. (1969) Z. Med. Mikrobiol. Immunol. 155, 156-170). La enzima tiene una amplia especificidad para proteínas nativas y desnaturalizadas y se usa habitualmente en la purificación de ADN y ARN. Los agentes desnaturalizantes tales como el dodecilsulfato sódico (SDS) o la urea, así como temperaturas elevadas de 50 a 60°C aumentan su actividad. La concentración recomendada es de 50 a 100 µg/ml para la eliminación de la proteína y la activación de la enzima, y de hasta 2 mg/ml para el tratamiento de tejidos. En la eliminación de las proteínas plasmáticas y séricas, la proteinasa K se usó preferentemente a una concentración final de 100 a 300 µg/ml de suero de 37 a 50°C. La proteinasa K normalmente se prepara en una disolución madre de 20 mg/ml (600 mAU/ml) a partir de un polvo liofilizado, y se almacena a -20°C hasta su uso. La enzima se activa en el intervalo de pH de 7,5 a 12. Alcanza su máxima actividad catalítica de 50 a 60°C. La proteinasa K requiere la presencia de iones calcio para su estabilidad, pero no para su actividad proteolítica. Según la invención, la digestión de las proteínas en el plasma o suero sanguíneos normalmente se produce durante un periodo de 60 minutos de 25 a 50°C, preferentemente de 30 a 40°C, lo más preferentemente de 37°C con 200 µg/ml de proteinasa K (a partir de una disolución madre que contiene 20 mg de proteinasa K/ml en Tris HCl 50 mM, pH 8,0; CaCl₂ 10 mM), opcionalmente en presencia de SDS al 0,1% o de agentes de liberación de vitamina D tales como la warfarina, 8-ANS, 1,8-ANS, ácidos toluensulfónicos y similares, más preferentemente en presencia de 0,1 a 10 mg/ml, lo más preferentemente de 0,5 a 2 mg/ml de 8-ANS.

Los estudios cristalográficos de difracción por rayos X han demostrado que la proteinasa K presenta dos sitios de unión de iones calcio (Bajorath y col., 1989, Nature 337, 481-484). A pesar de que el Ca²⁺ no participa de manera directa en el mecanismo catalítico, su eliminación reduce la actividad de la proteinasa K al 20% aproximadamente del valor original, medida usando un sustrato patrón de Succinil-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida sintético. Según la invención, la eliminación del Ca²⁺ se consigue con la adición de agentes secuestradores y quelantes, tales como etilendiaminetetraacetato (EDTA) o etilenglicoltetraacetato (EGTA) en una concentración de, por ejemplo, 2 a 10 mmol/ml. La proteinasa K se desactiva adicionalmente mediante inhibidores de serina proteasa tales como fluoruro de fenilmetil-sulfonilo (PMSF), diisopropilfluorofosfato (DFP) o fluoruro de 4-(2-aminoetil)bencenosulfonilo (AEBSF). El AEBSF tiene un espectro de actividad similar al PMSF, pero es considerablemente más estable, especialmente en un entorno de pH bajo. Normalmente, se usan disoluciones con una concentración de 0,1 a 1 mM. Reactivos de sulfhidrilo, tales como para-cloromercuribenzoato (PCMB), L-1-tosilamido-2-feniletilclorometilcetona (TPCK), N-alfa-p-tosil-L-lisil-clorometilcetona, N-etilmaleimida (NEM), yodacetamida, y o-fenantrolina, tienen sólo una influencia limitada sobre la actividad de la proteinasa K.

El pH de la muestra se ajusta de 3,0 a 10,0, preferentemente de 7,0 a 8,0 para el análisis de unión de proteínas sobre el anticuerpo. En una realización especialmente preferida, el análisis de unión de proteínas sobre el anticuerpo se lleva a cabo a un pH de 6,0 a 8,0. Además, los tampones contienen un exceso de agentes secuestradores y quelantes tales como etilendiaminetetraacetato (EDTA) o etilenglicoltetraacetato (EGTA), por ejemplo, entre 2 y 10 mmol/ml, para unir el Ca²⁺ libre. No es necesario añadir iones Ca²⁺ para la digestión con la proteinasa K, puesto que la concentración natural de calcio en el suero es suficiente, para contrarrestar cualquier actividad remanente de la proteasa. Finalmente, el tampón de dilución para el análisis de unión de proteínas contiene del 0,5 al 10% en peso de gelatina, preferentemente del 0,5 al 2% en peso de gelatina, así como 1 mmol/l de β-mercaptoetanol. Por tanto, el tampón de unión preferentemente contiene un tampón con 50 mmol/l de tampón NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 6,0 a 10,0 (se prefiere pH 8,0), 1 al 2% de gelatina (se prefiere del 0,05 al 0,5%), 2-5 mmol/l de EGTA, β-mercaptoetanol 0,005-2 mM (se prefiere el 0,005% en peso), así como, opcionalmente, un inhibidor de la proteinasa K.

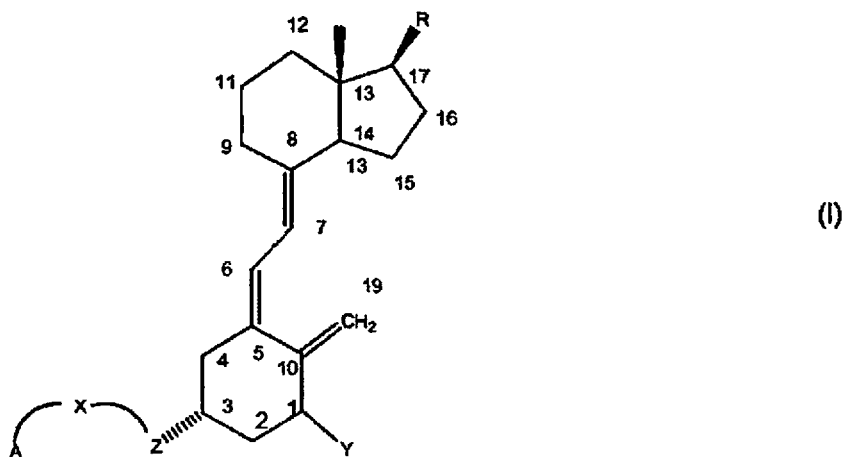
Opcionalmente, se puede añadir del 0,1 al 5% en peso, preferentemente del 1 al 3% en peso, de ciclodextrina natural y/o modificada químicamente, para evitar interferencias con ácidos grasos libres, colesterol y otros lípidos en el análisis de unión. En una realización preferida, los tampones de lavado y dilución contienen por tanto ciclodextrina, para el secuestro y enmascaramiento de moléculas que interfieran tales como ácidos grasos, colesterol, etc. La ciclodextrina se añade preferentemente del 0,1 al 10% en peso, preferentemente del 0,2 a 7,5% en peso, lo más preferentemente del 1 al 5% en peso, basado en la concentración final de la muestra. La ciclodextrina también puede estar modificada químicamente, por ejemplo, con grupos metilo, etilo, propilo, hidroxietilo, 2-hidroxipropilo, glicosilo, maltosilo, carboximetilo. Las ciclodextrinas naturales y la 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina son especialmente preferidas.

El procedimiento según la invención es adecuado para la determinación cuantitativa de la 25-hidroxivitamina D₂, la 25-hidroxivitamina D₃, y, en una realización alternativa, para la determinación de la 1α,25-dihidroxivitamina D₂ y la 1α,25-dihidroxivitamina D₃. Si se tiene que determinar la concentración de la hormona D es necesaria la purificación de la muestra, aparte de la forma de almacenamiento de la vitamina D. La hormona D se identifica mediante la unión a un anticuerpo, que es específico para las especies dihidroxi. Se conocen anticuerpos monoclonales, que son específicos para la hormona D, pero no para la 25-hidroxivitamina D.

El ensayo de unión a proteínas según la invención se puede llevar a cabo en forma de ELISA (ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas) o de RIA (radioinmunoensayo). Se prefieren especialmente sistemas no radiactivos basados en marcadores fluorescentes y quimioluminiscentes (FIA o LIA). Si el trazador de la vitamina D está acoplado a una enzima, por ejemplo, a una fosfatasa alcalina o a un marcador fluorescente o quimioluminiscente, entonces la fase sólida o la pared del vaso de reacción normalmente está recubierta con anticuerpos contra el compuesto de vitamina D a determinar.

En el procedimiento según la invención, es ventajoso que la determinación cuantitativa de los metabolitos de la vitamina D se pueda llevar a cabo directamente en una muestra líquida tal como suero o plasma. La muestra no necesita preparación como en el caso de la precipitación de proteínas, extracción orgánica y/o cromatografía en columna problemáticas. En vez de eso, los metabolitos de la vitamina D que se deben determinar se desasocian de sus sitios de unión mediante digestión con la proteasa K de las proteínas de unión a vitamina D (VDBP, albúmina y muchas otras). Naturalmente, los compuestos salicílicos pueden desasociar los metabolitos de la vitamina D de una proteína *in vitro*, pero este procedimiento no puede evitar la participación de proteínas derivadas en forma reactivada en los análisis de unión. Nuestros análisis sugieren que el complejo proteína de unión a vitamina D/salicilato también se absorbe sobre la pared y posteriormente también se unirá al trazador de la vitamina D. Como se ha mencionado previamente, las proteínas de unión a vitamina D no sólo comprenden las VDBP altamente específicas (Gc-globulina o componente específico de grupo), sino también proteínas abundantes tales como albúmina, α -fetoproteína y muchas otras. Estas proteínas también se pueden unir a la 25-hidroxivitamina D y a la $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina D con mayor o menor especificidad y afinidad. Si la purificación de las muestras de vitamina D es comparativamente incompleta, como en el caso de la precipitación de proteínas mediante etanol o por desnaturalización, entonces las proteínas que permanecen en la disolución de muestra se pueden unir al trazador de la vitamina D durante el ensayo de unión por competición, y la determinación cuantitativa de vitamina D depende de casualidades, tales como la completitud de la precipitación de proteínas y de la cantidad de colesterol en la muestra. La extracción orgánica y/o purificación cromatográfica de los compuestos de vitamina D no mejora la determinación cuantitativa, debido a que estas etapas también influyen y varían la cantidad de vitamina D que puede rastrearse, dependiendo de las propiedades de la muestra - entre otras, de cuántas proteínas de unión a vitamina D están presentes en la muestra, o de si es lipaémica, etc. Por otra parte, el procedimiento según la presente invención tiene la ventaja de que no es necesaria una purificación propensa a errores de los metabolitos de la vitamina D y de que el ensayo de unión a proteínas se lleva a cabo directamente en el plasma o suero.

La invención también comprende el uso de derivados de la vitamina D con la fórmula I:



en la que Z es el átomo de oxígeno o azufre de un grupo éter o un carbono; X es un resto hidrocarbonado sustituido o no sustituido de 0,8 a 4,2 nm de longitud; Y es hidrógeno o un grupo hidroxilo; A es una fase sólida (pared del vaso, cuentas, partículas sólidas marcadas o partículas magnéticas), o un grupo funcional, que puede estar unido mediante una proteína que resiste a la proteinasa K con una alta afinidad, por ejemplo, anticuerpos monoclonales o estreptavidina, para el acoplamiento del derivado funcional de la vitamina D a la fase sólida; R es la cadena lateral del metabolito de la vitamina D, preferentemente de la cadena lateral 25-hidroxilada de la vitamina D₂ o la vitamina D₃.

El enlazador X es un grupo C₈ a C₁₂, que puede contener heteroátomos habituales tales como S, O, N o P, un péptido, una cetona o un resto aminopoliéter sustituido o sin sustituir con una longitud de 0,8 a 4,2 nm, preferentemente de 0,9 a 1,5 nm aproximadamente, lo más preferentemente un ácido aminoundecanoico o un grupo enlazador hexamido, octamido o decamido-amidopropilo. Este hueco entre el grupo A y el determinante antigénico de la vitamina D, que comprende la cadena lateral R y el grupo Y, permite que los anticuerpos monoclonales se puedan unir sin interferencia de la fase sólida. Se prefieren la 25-hidroxivitamina D-3 β -3-[6-N-(biotinil)hexamido]amidopropiléter y el compuesto de $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina D biotina correspondiente, que están acoplados a la fase sólida a través de la estreptavidina.

El procedimiento según la invención permite por tanto una determinación cuantitativa no radiactiva de la 25-hidroxivitamina D y la $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina D en suero o plasma sin necesidad de una preparación compleja de la muestra. Por consiguiente, el procedimiento es especialmente adecuado para la prueba secuencial para la profilaxis de la osteoporosis.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un kit de reactivos para la determinación de metabolitos de la vitamina D tales como la 25-hidroxivitamina D y la $1\alpha,25$ -dihidroxivitamina D que comprende, entre otros, un

derivado funcional de la vitamina D y una disolución apropiada de la proteinasa K. Opcionalmente, el kit comprende anticuerpos anti-vitamina D, que significa anticuerpos contra la 25-hidroxivitamina D_{2/3} o la 1 α ,25-dihidroxivitamina D_{2/3} o metabolitos diferentes de la vitamina D, placas de microvaloración recubiertas y/o micropartículas y reactivos magnéticos o diferentes.

En principio, en lugar de muestras de plasma o de suero, se pueden analizar directamente productos alimenticios, tales como leche o queso, etc., para su contenido en vitamina D. En ciertos casos, puede ser obvia la eliminación de sustancias que interfieran mediante extracción o precipitación de la muestra, dependiendo del carácter de la matriz. Las interferencias de las proteínas de unión a vitamina D que permanecen después de la purificación se pueden eliminar entonces mediante digestión con proteinasa K.

Ejemplo 1

Determinación de la 25-hidroxivitamina D en suero o plasma

(i) Unión de los trazadores de vitamina D a una fase sólida

Se acopló la 25-hidroxivitamina D-3 β -3-[6-N-(biotinil)hexamido]amidopropiléter a una fase sólida a través de estreptavidina. Para ello, primero se introdujeron porciones de 100 ng de estreptavidina en las cavidades de una placa de microvaloración, disueltos en 200 μ l de bicarbonato sódico 60 mM a pH 9,6, y la placa se incubó durante toda la noche a 4°C. A continuación se retiraron las disoluciones de estreptavidina y las cavidades se lavaron 5 veces con 200 μ l de la disolución tampón de lavado (tampón fosfato 50 mmol/l, pH 6,0, Tween 20 al 0,05%). A continuación se introdujeron 250 μ l de tampón de bloqueo (tampón fosfato, pH 6,0 con caseína al 0,5%, gelatina al 1%, timerosal al 1%) en cada cavidad, se incubó durante 1 hora y a continuación se retiró, y cada cavidad se lavó de nuevo 5 veces con 200 μ l de tampón de lavado. A continuación, se introdujeron 10 ng de 25-biotina-hidroxivitamina D en 200 μ l de tampón de lavado en cada una de las cavidades, se incubó durante toda la noche en oscuridad con agitación de 2 a 8°C, las disoluciones de biotina-vitamina D se retiraron y las cavidades se lavaron de nuevo 5 veces con 200 μ l de tampón de lavado. A esto le siguió la unión de un anticuerpo de ratón monoclonal (ID2) con vitamina D en presencia de 25-hidroxivitamina D del patrón líquido o de una muestra.

(ii) Manipulación y preparación de la muestra

Las muestras de suero y plasma sólo se almacenaron durante un corto periodo de tiempo a temperatura ambiente. Si el análisis se lleva a cabo en las 24 horas siguientes a la recogida de la muestra, la muestra se almacena de 4 a 8°C. En otro caso, las muestras se almacenan a -20°C hasta su análisis. Se evita la congelación y descongelación múltiple de la muestra. La hemólisis no interfiere con los resultados. No se puede usar sangre completa como material de muestra. Las muestras lipémicas se centrifugaron durante 10 minutos a 30.000 g aproximadamente, y la fase acuosa se retiró a continuación a través de la capa grasa sobrenadante usando una pipeta. En el caso de muestras altamente lipaémicas, se usó un kit de deslipidación.

80 μ l de plasma o suero sanguíneo se añadieron a 800 μ l de disolución de proteinasa K (200 μ g/ml de proteinasa K en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; CaCl₂ 10 mM, SDS al 10% o 1 mg/ml de 8-ANS), se mezcló bien y se incubó durante 1 hora a 37°C en un baño de agua. Durante este tiempo la proteinasa K rompe las VDBP (Gc-globulina) y otras proteínas séricas de unión a vitamina D tales como albúmina hasta un grado en el que ya no se pueden unir a 25-hidroxivitamina D_{2/3} o dihidroxivitamina D_{2/3}.

(iii) Unión competitiva

Se introdujeron 200 μ l de anticuerpo monoclonal de ratón anti-25-OH-vitamina D (1:125.000) en tampón de lavado (tampón fosfato 50 mM, pH 8,0, EGTA 2,0 mM, β -mercaptoetanol al 0,005%, 0,1% (p/v) de gelatina, opcionalmente, del 0,5 al 10% de ácido salicílico) y 20 μ l de patrón, de control o de muestra en cada una de las cavidades. La placa de microvaloración se agitó durante toda la noche en oscuridad de 8 a 10°C. La 25-hidroxivitamina D en la muestra competiría con el trazador de la vitamina D en la pared por los sitios de unión sobre el anticuerpo monoclonal anti-vitamina D. A continuación las disoluciones se retiraron de las cavidades y cada una de las cavidades se lavó 5 veces con 250 μ l de tampón de lavado.

El pH, la gelatina en el tampón y la retirada del Ca²⁺ libre mediante el EGTA consiguieron que el anticuerpo monoclonal no resultase roto por cualquier cantidad remanente de proteinasa K durante el análisis de unión por competición. No obstante, las proteínas de unión a vitamina D presentes en la muestra, tales como la seroalbúmina, ya no se podían unir al trazador de la vitamina D, que a menudo da lugar en el estado de la técnica a contenidos en vitamina D erróneamente elevados.

(iv) Determinación de la unión competitiva

Se disolvieron 200 μ l de conjugado (marcado con anticuerpo de cabra anti-ratón-MAB-peroxidasa) a 1:2500 en tampón de lavado, se introdujeron en las cavidades, y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente mientras se agitaba. A continuación las disoluciones se retiraron y cada una de las cavidades se lavó 5 veces con 250 μ l de tampón de lavado. Para la reacción de color, se introdujeron 200 μ l de una disolución sustrato de tetrametilbencidina

ES 2 348 126 T3

(TMB) (de BioFX Laboratories Inc.) en las cavidades. Después de 20 minutos, la generación de color se detuvo con la adición de 50 μ l de H₂SO₄ 2 M por cavidad. Las mediciones de la densidad óptica se llevaron a cabo en un fotómetro a 450 nm con una longitud de onda de referencia de 620 nm (o 690 nm).

5 Ejemplo 2

Sensibilidad analítica del sistema de ensayo proteolítico según la invención

10 Para determinar el límite de detección del sistema de ensayo según la invención, esencialmente se llevó a cabo la unión por competición y las mediciones del Ejemplo 1, excepto que la muestra no contenía cantidades normales de metabolito de la vitamina D o contenía cantidades normales de metabolito de la vitamina definidas. Los resultados se presentan en la Tabla I siguiente.

15 TABLA I

Límite de detección de la 25-hidroxivitamina D en un sistema proteolítico

20	Muestra con 0 nmol de Vit. D/l 40x		Densidad óptica de la curva de calibración patrón		
			DO1	DO2	Patrón nmol/l
25	1,388	1,424	1,442	1,374	0
	1,438	1,376	1,172	1,196	6,4
	1,46	1,376	0,988	0,871	16
30	1,369	1,409	0,63	0,554	40
	1,504	1,463	0,373	0,312	100
35	1,418	1,339	0,269	0,25	250
	1,396	1,34			
	1,476	1,401			
40	1,37	1,318			
	1,424	1,449			
	1,554	1,36			
45	1,354	1,373			
	1,404	1,392			
	1,386	1,413			
50	1,421	1,398			
	1,48	1,439			
55	1,382	1,43			
	1,366	1,411			
	1,328	1,469			
60	1,415	1,476			

La DO media para la muestra del blanco fue de 1,41, con una desviación estándar de 0,05 unidades de DO. El límite de detección de la 25-hidroxivitamina D fue únicamente de 2 nmol/l, que es de 0,8 ng/l aproximadamente (valor medio - 2 x desviación estándar, insertado en las curvas de calibración), que es completamente suficiente para la determinación de un intervalo fisiológicamente relevante de concentraciones de vitamina D en suero.

ES 2 348 126 T3

Ejemplo 3

Reproducibilidad del sistema proteolítico

- 5 Se determinó la correspondencia entre las mediciones independientes para el sistema proteolítico 1. La precisión resulta de la desviación estándar y de las desviaciones estándar relativas (los coeficientes de variación) entre los valores discretos y la media. Se usó una muestra de suero patrón como muestra de referencia positiva. La concentración media fue de 41,4 nmol de 25-OH-Vit.D/l. Para los valores restantes, se usó el límite de detección determinado. Los resultados para la muestra sérica se presentan en la Tabla II.

10

TABLA II

Varianza del intra-ensayo del procedimiento proteolítico

15

20

25

30

	Curvas de calibración		
1 muestra, 20 pasadas	DO1	DO2	Patrón nmol/l
	1,442	1,374	0
Densidad óptica media: 0,622	1,196	1,172	6,4
	0,988	0,871	16
Concentración media: 41,4 nmol/l	0,63	0,554	40
	0,373	0,312	100
Varianza del intra-ensayo: 10%	0,269	0,25	250

35

La precisión entre series de análisis separados (inter-ensayos) representa las variaciones de uno o más factores conocidos y desconocidos. Para conseguir esto, se preparó la muestra anterior y se analizó 10 veces en días diferentes. Los resultados se presentan en la Tabla III:

40

TABLA III

Varianza del inter-ensayo del procedimiento proteolítico

45

50

55

60

65

Inter-ensayo de una muestra 10 veces en días diferentes	Medición en nmol/l
	40,0
	33,6
	38,6
	36,5
	43,6
Media: 38,7 nmol/l	38,1
	44,8
	38,0
Valor de estabilidad/media * 100 = CV	38,0
	35,8
CV en%	8,31

Por tanto, la varianza del inter-ensayo es del 8,31%

Ejemplo 4

Análisis de comparación y correlación de los procedimientos

5 Se determinó la precisión de las mediciones con una correlación de los resultados cuantitativos procedentes de sistemas de prueba diferentes para la detección de los mismos analitos. El objeto del análisis de correlación era, por una parte, el sistema proteolítico según la invención y, por otra, un ELISA según los documentos DE 10144 905 y EP1097132. Los procedimientos diferían principalmente en la preparación de las muestras. El procedimiento proteolítico se llevó a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 1. La Figura 1 y la Tabla IV muestran una correlación de las mediciones.

TABLA IV

Correlación de los resultados usando un ELISA convencional y el procedimiento proteolítico

Muestra	Resultado del procedimiento convencional	Resultado del procedimiento proteolítico
	nmol/l	nmol/l
Plasma 1	5	4,2
2	20	22,9
3	40	32,2
4	5	9,6
CS	30	13,6
Suero 1	50	63,9
2	10	10,6
3	20	27,1
4	30	23,2
DS1	12	2,9
DS2	11	2,3
Elevado 1	150	81,4
2	90	50,6
3	101	96,7

DS = suero deficiente;

Elevado = suero con niveles elevados conocidos de 25-OH-Vit.D;

CS = el propio plasma sanguíneo

El análisis de correlación muestra ventajas diferentes para el protocolo proteolítico de la invención y la medición directa en suero. Especialmente en el caso de suero deficiente, se producen resultados de valores demasiado elevados después de las disociaciones, en los que presumiblemente proteínas séricas y plasmáticas de unión a la vitamina D, tales como las VDBP (Gc-globulina) unen el trazador de la vitamina D a la fase sólida. Por tanto, el nivel de Gc-globulina en suero o plasma interfiere con la determinación de la vitamina D. El análisis de correlación muestra una regresión de desviación a valores bajos de vitamina D.

Además, el procedimiento según la invención se comparó con un inmunoensayo enzimático de la vitamina D comercial de IDS Ltd., RU. El kit de la 25-hidroxivitamina D de IDS es un inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de 25-hidroxivitamina D y otros metabolitos hidroxilados en suero o plasma. En él, el patrón, los

controles y las muestras se tratan con un tampón de disociación privado de IDS (que probablemente contiene warfarina como agente de desplazamiento de la vitamina D), a continuación se añade una cantidad conocida de 25-hidroxivitamina D como competidor de unión, y las muestras diluidas de esta forma se incuban durante 2 horas en las cavidades de una placa de microvaloración, que están recubiertas con un anticuerpo específico para la 25-hidroxivitamina D, a continuación se aspiran y finalmente las placas se lavan. La unión de biotina marcada con 25-hidroxivitamina D se detectó con avidina marcada con peroxidasa de rábano, que se une selectivamente a la biotina. Después de una etapa de lavado adicional, se llevó a cabo el revelado del color en un sustrato cromogénico (TMB) como en el Ejemplo 1. La absorción de la mezcla de reacción interrumpida se midió en fotómetro de placas de microvaloración, en el que la intensidad medida del color era inversamente proporcional a la concentración de 25-hidroxivitamina D. El kit de prueba de IDS usa un reactivo propiedad de la empresa no descrito para la disociación de la 25-hidroxivitamina D y sus metabolitos de las proteínas de unión en suero o plasma.

La Figura 2 muestra la correlación de los resultados cuantitativos únicos (84 sueros) de los dos procedimientos/prueba para la detección de 25-hidroxivitamina D y sus metabolitos hidrolizados. Los resultados están alrededor y son paralelos a la recta de identidad. El coeficiente de correlación R es de 0,969. No obstante, la regresión está paralela. Por tanto, el ELISA de IDS con el procedimiento de disociación produce valores demasiado elevados de manera consistente.

Ejemplo 5

Comparación de valores medidos usando LC-MS/MS y HPLC

La Figura 3 muestra una tabla de correlación de dos procedimientos de referencia analíticos establecidos diferentes, que se miden por HPLC y LC-MS/MS. Muestra que estos dos procedimientos están en concordancia de manera que se pueden usar como referencia para determinar la precisión de los valores obtenidos mediante los inmunoensayos directos e indirectos de la vitamina D.

Se analizó un grupo de 291 muestras usando el ensayo comercial de IDS (véase Ejemplo 4) y los resultados se compararon con los resultados obtenidos usando el análisis por LC-MS/MS. La preparación de la muestra y el ELISA se llevaron a cabo ciñéndose estrictamente a las instrucciones suministradas con el kit de prueba. La Figura 4 es una gráfica Bland y Altman que representa la diferencia relativa entre las mediciones obtenidas por los dos procedimientos (Bland JM, Altman DG (1986) Statistical method for assessing agreement between two methods of clinical measurement. The Lancet, i, 307-310; Bland JM, Altman DG (1999) Measuring agreement in method comparison studies. Statistical Methods in Medical Research, 8, 135-160).

La distribución de las mediciones muestra que a concentraciones más bajas (clínicamente relevantes), el procedimiento de IDS lleva a sobreestimar el contenido en vitamina D, mientras que a concentraciones más altas, el procedimiento de IDS subestima el contenido en vitamina D.

Se analizó un grupo adicional de 40 muestras usando el procedimiento según la presente invención y usando la medición por HPLC. Los resultados se presentan en la Tabla 5.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 348 126 T3

TABLA V

Correlación de los resultados mediante el procedimiento proteolítico y por HPLC

Muestra	Valores del procedimiento proteolítico ($\mu\text{g/l}$)	Valores del procedimiento por HPLC ($\mu\text{g/l}$)
N°		
1	31,8	43,7
2	18,3	14,5
3	69,1	67,9
4	42,5	47,4
5	15,2	13,4
6	13,1	
7	59,9	54,8
8	18,5	12,5
9	53,3	51,1
10	105,5	113,6
11	23,7	35,0
12	35,0	33,0
13	29,7	34,7
14	43,4	32,3
15	87,6	86,2
16	70,3	59,2
17	63,2	56,7
18	38,8	39,5
19	26,0	28,8
20	26,3	27,4
21	29,2	38,7
22	23,8	23,6
23	48,7	47,0
24	59,1	54,8

ES 2 348 126 T3

25	27,0	4,5
26	24,7	23,2
27	70,9	57,0
28	41,9	41,3
29	50,9	46,0
30	38,3	61,3
31	25,7	29,2
32	45,3	39,7
33	39,7	40,6
34	28,1	23,1
35	44,0	40,5
36	15,4	17,3
37	98,3	66,9
38	15,8	16,8
39	46,0	52,7
40	25,5	23,1

No hubo medición por HPLC para la muestra 6, que por tanto se ignoró. Los dos grupos de mediciones se compararon usando la prueba t de muestras emparejadas, como se presenta en la Tabla VI.

TABLA VI

Prueba t de muestras emparejadas

	Procedimiento proteolítico	Procedimiento por HPLC
Tamaño de muestra	39	39
Media aritmética	41,0000	42,4718
IC al 95% para la media	34,0639-47,9361	35,1970-49,7465
Varianza	457,8284	503,6294
Desviación estándar	21,3969	22,4417
Error estándar de la media	3,4263	3,5935
Diferencia media	1,4718	
Desviación estándar	9,1468	
IC al 95%	-1,4932 - 4,4368	
Prueba estadística t	1,005	
Grados de libertad	38	
Probabilidad de dos colas	P = 0,3213	

La prueba t de muestras emparejadas muestra que no hay diferencias significativas entre las mediciones obtenidas mediante el procedimiento según la invención comparadas con las mediciones de referencia por HPLC. La Figura 5 es una gráfica de cajas y bigotes de las mediciones obtenidas mediante los dos procedimientos, que muestra un patrón de distribución similar obtenido por las mediciones usando el procedimiento de la invención y el procedimiento de referencia. La Figura 6 es una gráfica de correlación de los dos procedimientos, que visualiza la gran concordancia de los valores obtenidos por los procedimientos. La Figura 7 muestra la diferencia en porcentaje entre los resultados usando el procedimiento de la invención comparado con las mediciones de referencia por HPLC. Se demuestra una sobreestimación muy baja (<2%) por el procedimiento proteolítico comparado con el de referencia, y la consistencia de las mediciones.

Las muestras se analizaron adicionalmente usando diferentes procedimientos comerciales. La distribución de los resultados está representada en la gráfica de cajas y bigotes de la Figura 8. Esta muestra que los ensayos de la vitamina D de DiaSorin (LIA y RIA) (DiaSorin S.p.A.) y el ensayo de IDS proporcionan de manera consistente resultados demasiado bajos comparados con las mediciones de referencia por HPLC, mientras que el procedimiento de la invención, así como el ensayo de prueba de la vitamina D de Elecsys (Roche Diagnostics) proporciona lecturas comparables a las de la referencia. No obstante, la prueba de Roche es un procedimiento indirecto y requiere la preparación de la muestra, lo que supone una desventaja comparado con el procedimiento de la invención.

Estos resultados muestran claramente que el procedimiento de medición directo según la invención proporciona una mejor correlación con los procedimientos de referencia establecidos comparado con la técnica anterior.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para cuantificar metabolitos de la vitamina D directamente en plasma o suero sanguíneos, sin necesidad de purificación previa de los metabolitos de la vitamina D, que comprende las siguientes etapas:

(a) adición de una cantidad apropiada de una serina proteasa con actividad endo y exoproteolítica a una muestra que contiene plasma o suero sanguíneos y la digestión de las proteínas de unión a vitamina D en el plasma o suero sanguíneos, hasta que ya no puedan unir más metabolitos de la vitamina D;

(b) dilución de dicha muestra que contiene la serina proteasa, los metabolitos de la vitamina D y las proteínas plasmáticas o séricas digeridas usando un tampón de dilución, en el que la serina proteasa es sustancialmente inactiva;

(c) proporción de una composición trazadora de la vitamina D, que está acoplada a una fase sólida;

(d) proporción de un anticuerpo monoclonal contra los metabolitos pertinentes de la vitamina D;

(e) combinación de la muestra con los metabolitos de la vitamina D, la fase sólida con la composición trazadora de la vitamina D y el anticuerpo monoclonal, y la realización durante un periodo de tiempo predeterminado de una reacción de unión competitiva entre los metabolitos de la vitamina D, el trazador de la vitamina D unido a una fase sólida y el anticuerpo monoclonal en un tampón de unión en el que la serina proteasa es sustancialmente inactiva;

(f) separación de la fase sólida con el compuesto trazador de la vitamina D y del anticuerpo monoclonal unido del tampón de unión, y opcionalmente, el lavado de la fase sólida; y

(g) determinación de la cantidad de anticuerpo monoclonal sobre la fase sólida, y cuantificación de los metabolitos de la vitamina D en el plasma o suero sanguíneos por correlación con muestras patrón.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la serina proteasa es proteinasa K.

3. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el anticuerpo monoclonal se une a uno o más de 25-hidroxivitamina D₃, 25-hidroxivitamina D₂, 1 α ,25-dihidroxivitamina D₂ y 1 α ,25-dihidroxivitamina D₃.

4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el metabolito de la vitamina D medido directamente se selecciona del grupo constituido por 25-hidroxivitamina D₂, 25-hidroxivitamina D₃, 1 α ,25-dihidroxivitamina D₂ y 1 α ,25-dihidroxivitamina D₃.

5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el ensayo de unión a proteínas es uno de ELISA (ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas), RIA (radioinmunoensayo), FIA (inmunoensayo de fluorescencia), LIA (inmunoensayo de luminiscencia), o ILMA (ensayo inmunoluminométrico).

6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la digestión de la proteína de la etapa a) se lleva a cabo dentro de un intervalo de pH de 6,0 a 10 en presencia de 0,1 a 10 mg/ml de uno o más agentes desnaturantes de proteínas y agentes de liberación de vitamina D seleccionados entre ácido salicílico, ácido toluensulfónico, ácidos naftalensulfónicos, ácidos anilinaftalensulfónicos, dodecilsulfato sódico, warfarina.

7. Kit de prueba para cuantificar metabolitos de la vitamina D directamente en plasma o suero sanguíneos, que comprende al menos

(i) uno o más anticuerpos específicos de metabolitos de la vitamina D,

(ii) un trazador de la vitamina D que está acoplado a una fase sólida,

(iii) proteinasa K en forma de disolución madre,

(iv) un tampón para uso con la proteinasa K que comprende uno o más agentes desnaturantes de proteínas y agentes de liberación de vitamina D seleccionados entre ácido salicílico, ácido toluensulfónico, ácidos naftalensulfónicos, ácidos anilinaftalensulfónicos, dodecilsulfato sódico, warfarina;

(v) un tampón para uso con el ensayo de unión competitivo que comprende adicionalmente un inhibidor de la proteinasa K.

8. El kit de prueba de la reivindicación 7, en el que el tampón (v) comprende EGTA de 0,1 a 50 mM y del 0,5 al 10% (p/p) de compuestos salicílicos y sus derivados.

9. El kit de prueba de la reivindicación 7, en el que el tampón (v) comprende agentes desnaturantes y agentes de liberación de vitamina D en una cantidad para obtener una concentración final de 0,1 a 10 mg/ml.

FIG. 1

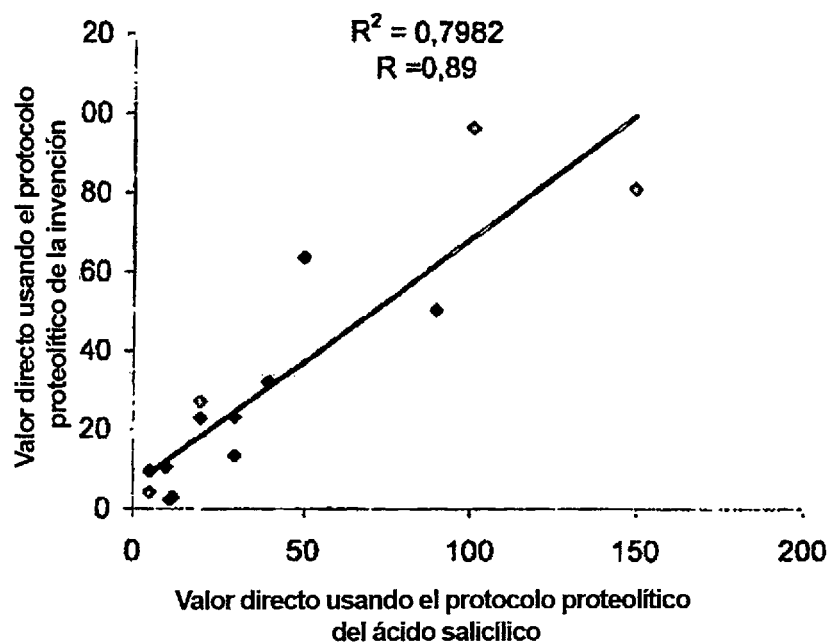


FIG. 2

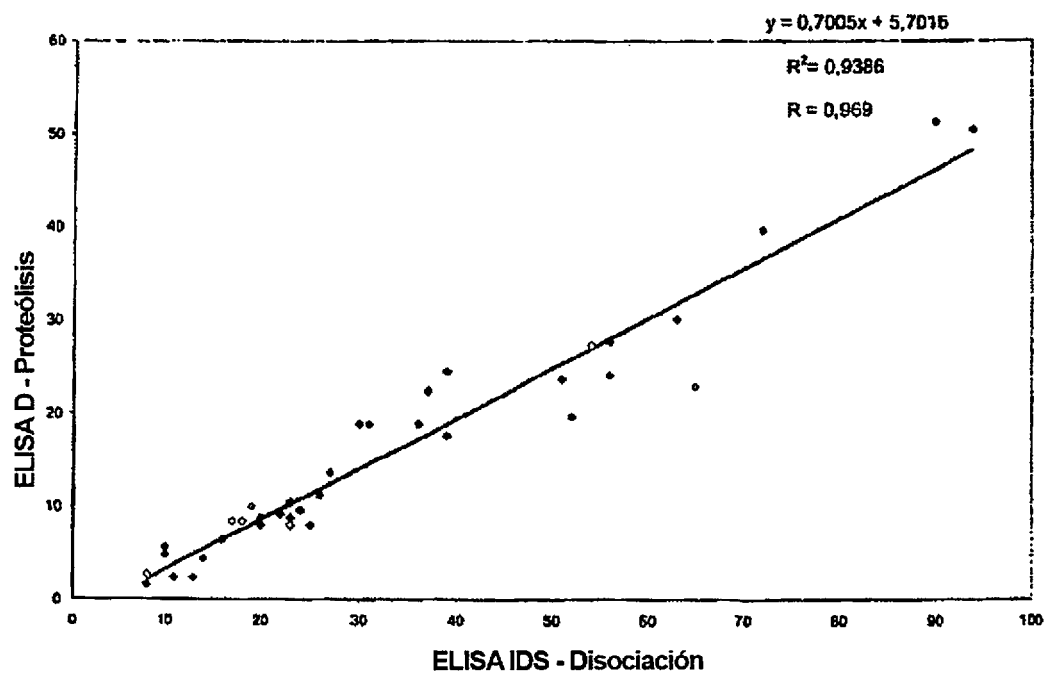


FIG. 3

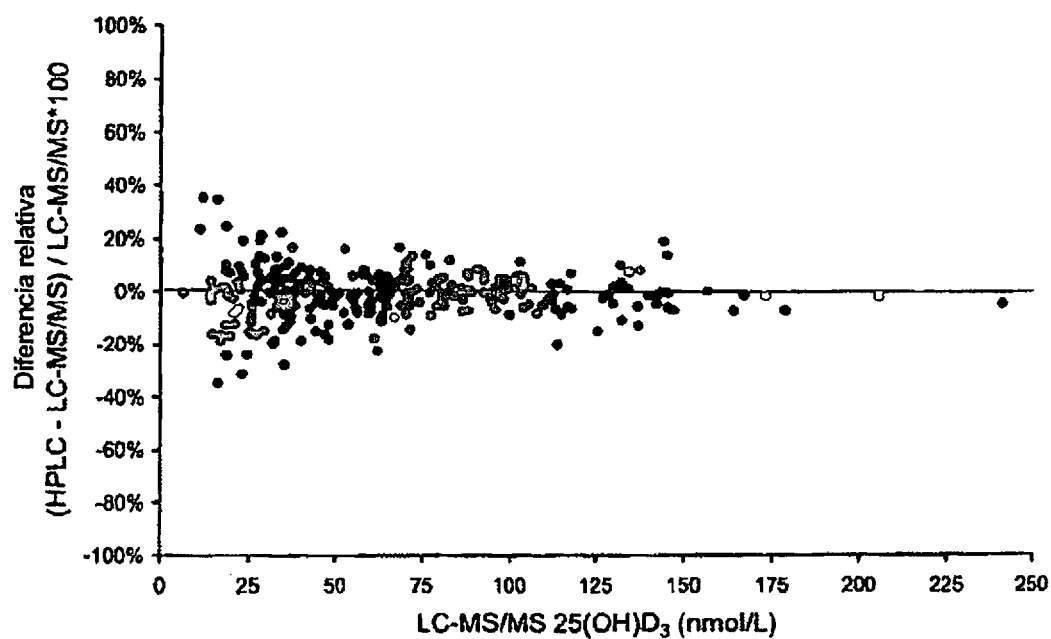


FIG. 4

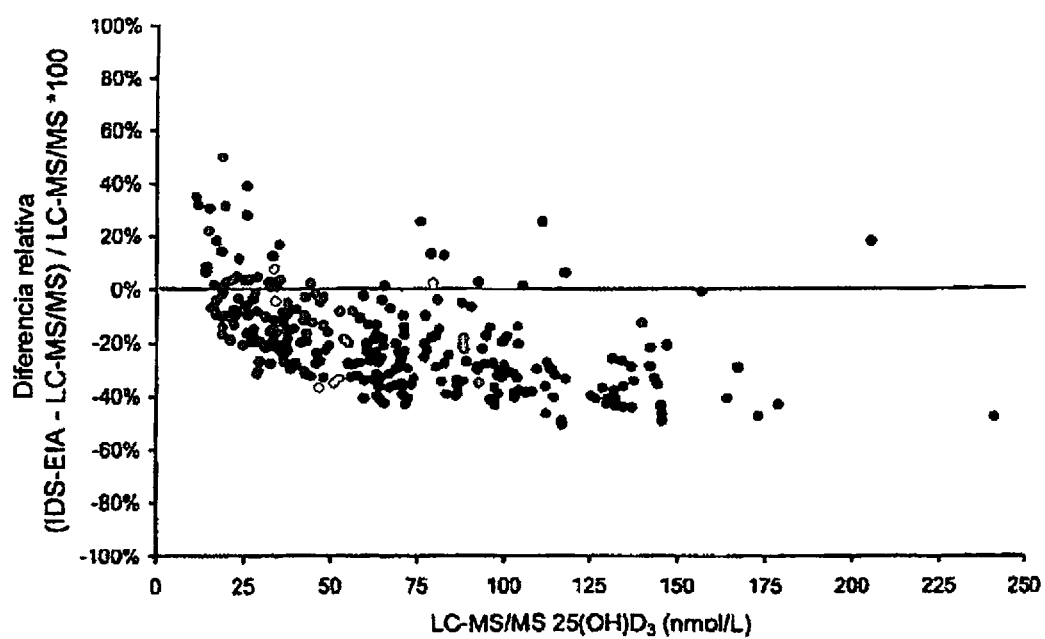


FIG. 5

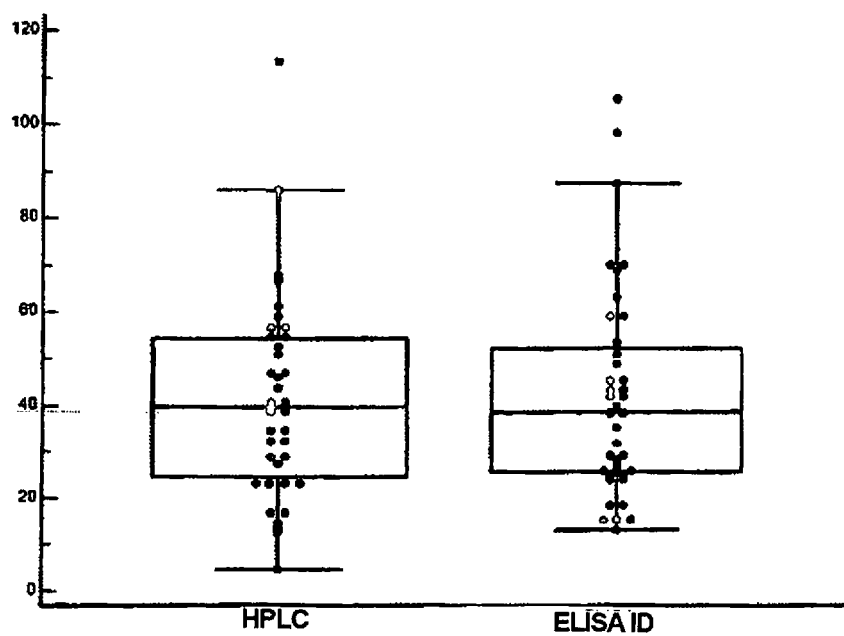


FIG. 6

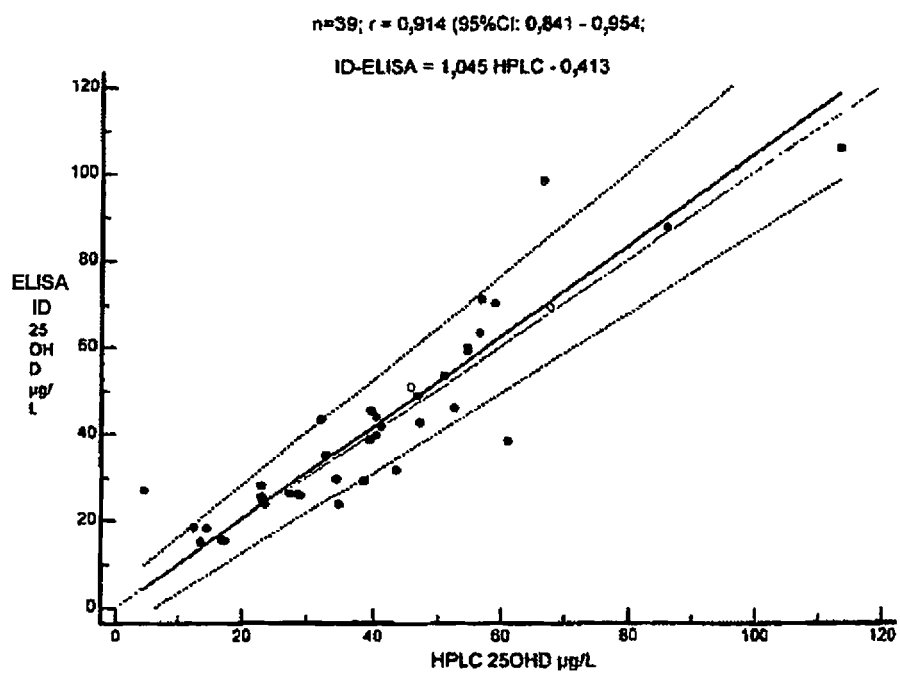


FIG. 7

Gráfica de Bland & Altman

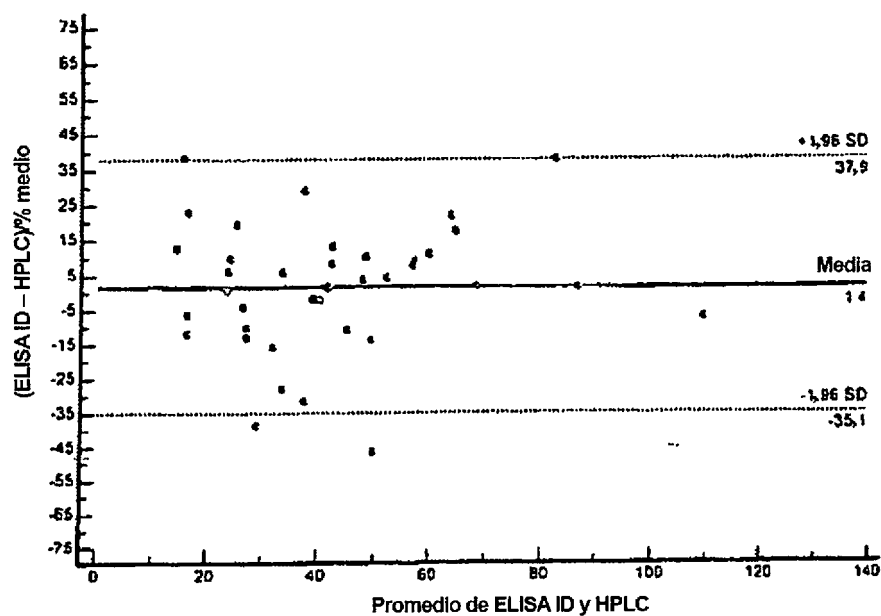


FIG. 8

Gráfica de cajas y bigotes

