



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 228**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/26 (2006.01)

C12Q 1/28 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 33/72 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04818960 .9**

96 Fecha de presentación : **18.11.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1693461**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2006**

54 Título: **Procedimiento de ensayo de proteína glicosilada.**

30 Prioridad: **19.11.2003 JP 2003-389891**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.07.2011

73 Titular/es: **SEKISUI MEDICAL Co., Ltd.**
13-5, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0027, JP

72 Inventor/es: **Taniguchi, Yuriko;**
Ebinuma, Hiroyuki y
Saito, Kazunori

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 363 228 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

Procedimiento de ensayo de proteína glicosilada

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento para ensayar proteína glicosilada, péptido glicosilado o aminoácido glicosilado contenido en una muestra.

10 **Técnica anterior**

La proteína glicosilada es una proteína no enzimáticamente glicosilada que es un compuesto de Amadori que se forma a partir de la transposición de Amadori tras la formación de una base de Schiff entre el grupo aldehído de un azúcar y el grupo amino de una proteína. Las proteínas glicosiladas están ubicuamente presentes en el cuerpo vivo. El nivel de concentración de proteína glicosilada en sangre está ampliamente influido por la concentración de monosacárido (por ejemplo, glucosa) disuelto en suero. Proteínas glicosiladas a modo de ejemplo incluyen proteínas cuyo grupo α -amino en el extremo amino está glicosilado (por ejemplo, hemoglobina glicosilada) y proteínas cuyos grupos ϵ -amino contenidos en residuos de lisina internos están glicosilados (por ejemplo, albúmina glicosilada). La concentración de albúmina glicosilada en suero o la relación de hemoglobina glicosilada con respecto a hemoglobina no glicosilada presente en eritrocitos refleja el nivel de azúcar promedio en un cierto periodo y, por tanto, se usa como un índice para el diagnóstico clínico tal como diagnóstico de diabetes, control de la afección patológica o juicio del efecto terapéutico.

Entre los ensayos de proteína glicosilada hay un procedimiento llamado "procedimiento enzimático" que puede realizarse con facilidad y es adaptable a un analizador automático comúnmente usado en laboratorios clínicos (por ejemplo, Documento de patente 1). El procedimiento enzimático consiste en una etapa de pretratamiento necesaria para la reacción de una proteasa con proteína glicosilada contenida en una muestra para así liberar el péptido glicosilado o aminoácido glicosilado, que sirve de sustrato en la siguiente etapa, y una etapa de ensayo necesaria para la reacción del sustrato libre con una enzima específica de péptido glicosilado o una enzima específica de aminoácido glicosilado (por ejemplo, oxidasa) para así producir una sustancia detectable (por ejemplo, peróxido de hidrógeno) y medir la sustancia. Una glucosa-oxidasa puede hacerse reaccionar con un sacárido liberado para producir peróxido de hidrógeno que puede usarse para medir la proteína glicosilada con una alta sensibilidad (Documento de patente 6).

Sin embargo, ha habido un problema con los procedimientos enzimáticos informados hasta la fecha ya que una proteasa empleada en la etapa de pretratamiento y una enzima específica empleada en la etapa de ensayo no tienen suficiente capacidad para reconocer diferencias entre proteína glicosilada, péptido glicosilado y aminoácido glicosilado (en lo sucesivo pueden denominarse colectivamente "proteína glicosilada o similares") y, por tanto, si la proteína glicosilada diana coexiste con otra proteína glicosilada que no ha sido elegida como diana para el ensayo, ambas proteínas reaccionan con la enzima específica y así se debilita la especificidad de dicho procedimiento.

Ejemplos de enzima específica de péptido glicosilado o enzima específica de aminoácido glicosilado que se usa en la etapa de pretratamiento incluyen una oxidasa que se produce a partir de una bacteria que pertenece al género *Corynebacterium* (véase, por ejemplo, Documento de patente 2) y una oxidasa que se produce a partir de una bacteria que pertenece al género *Aspergillus* (véase, por ejemplo, Documento de patente 3). Estas enzimas reaccionan eficazmente con aminoácido glicosilado, pero tienden a quedar sin reaccionar contra el péptido glicosilado. Recientemente se ha informado de una enzima que se obtiene mediante modificación de una fructosil-aminoácido-oxidasa (Documento de patente 4) y una fructosil-péptido-oxidasa derivadas de un hongo filamentoso (Documento de patente 5), además de dos fructosil-péptido-oxidasas de hongos (Documento de no patente 8). Se informa que estas oxidasas reaccionan específicamente con un péptido glicosilado, especialmente fructosil-valilhistidina, a pH 8,0. Un ensayo para fructosil-valina a pH ≤ 6 usando una fructosil-aminoácido-oxidasa se describe en el Documento de patente 7.

En la medición de hemoglobina glicosilada mediante el uso de una fructosil-aminoácido-oxidasa tal, la especificidad de la oxidasa se deriva de la diferencia en la reactividad de la oxidasa con fructosil-valina (la valina en el extremo amino de la subunidad de hemoglobina β está glicosilada) o fructosil-valilhistidina (un residuo de aminoácido se añade adicionalmente a fructosil-valina) y con ϵ -fructosil-lisina (el (los) residuo(s) de lisina en una proteína está(n) glicosilado(s)). Una molécula de hemoglobina tiene 44 residuos de lisina. Por tanto, incluso cuando la reactividad de una oxidasa con ϵ -fructosil-lisina sea baja, el efecto total de los residuos de ϵ -fructosil-lisina no debería ser ignorado. Además, un compuesto que contiene fructosil-lisina y se deriva de hemoglobina u otras proteínas del plasma (por ejemplo, albúmina glicosilada) o se deriva de un alimento o fármaco (en lo sucesivo puede denominarse "compuesto de fructosil-lisina") tiene que conllevar un riesgo que podría conducir a un error positivo. Un riesgo tal es difícil de evitar mientras se use un procedimiento de ensayo convencional.

65 [Documento de patente 1] JP-A-1999-127895
[Documento de patente 2] Publicación de patente japonesa (*kokoku*) nº H5-33997(1993)

[Documento de patente 3] JP-A-1991-155780

[Documento de patente 4] JP-A-2001-95598

[Documento de patente 5] JP-A-2003-235585

[Documento de patente 6] JP-A-2000-333696

[Documento de patente 7] JP-A-2001-204494

[Documento de no patente 8] Hirokawa, K., Gomi, K. y Kajiyama, N. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 311, 104-111

Divulgación de la invención

Problema(s) que va(n) a resolverse por la invención

Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento eficiente conveniente para ensayar proteína glicosilada, fructosil-péptido o fructosil-aminoácido, que puede aplicarse a una variedad de analizadores automáticos a la vez que se reduce efecto de compuestos de fructosil-lisina, y un reactivo empleado en el procedimiento.

Medios para resolver el problema

En vista de lo anterior, los presentes inventores han realizado amplios estudios y han encontrado que, en el ensayo de proteína glicosilada, fructosil-péptido o fructosil-aminoácido, el efecto de los compuestos de fructosil-lisina presentes en el sistema de reacción puede reducirse haciendo que una enzima para ensayar fructosil-péptido o fructosil-aminoácido (en lo sucesivo puede denominarse "enzima de ensayo") actúe sobre fructosil-péptido o fructosil-aminoácido a un pH de 4,0 a 7,0. La presente invención se ha realizado basándose en este hallazgo.

La presente invención proporciona un procedimiento para reducir el efecto de un compuesto de fructosil-lisina en el ensayo de fructosil-péptido o fructosil-aminoácido, caracterizado porque comprende hacer que una fructosil-péptido-oxidasa actúe sobre fructosil-péptido o fructosil-aminoácido a un pH de 4,0 a 7,0 y medir el producto resultante a un pH de 4,0 a 7,0.

La presente invención también proporciona un procedimiento para reducir el efecto de un compuesto de fructosil-lisina en el ensayo de proteína glicosilada de una muestra, caracterizado porque comprende tratar la muestra que contiene la proteína glicosilada con una proteasa para así liberar fructosil-péptido o fructosil-aminoácido libre, hacer que una fructosil-péptido-oxidasa actúe sobre la liberación de fructosil-péptido o fructosil-aminoácido a un pH de 4,0 a 7,0 y medir el producto resultante a un pH de 4,0 a 7,0.

También se describe un reactivo para ensayar proteína glicosilada con efecto reducido de un compuesto de fructosil-lisina que contiene al menos (A) una proteasa, (B) una fructosil-péptido-oxidasa que actúa sobre fructosil-péptido o fructosil-aminoácido a un pH de 4,0 a 7,0 para así producir peróxido de hidrógeno, y (C) un reactivo para medir peróxido de hidrógeno.

La presente invención también proporciona un procedimiento para reducir el efecto de un compuesto de fructosil-lisina en el ensayo de fructosil-péptido o fructosil-aminoácido, caracterizado porque comprende hacer que actúen al menos los (A) a (C) siguientes sobre fructosil-péptido o fructosil-aminoácido a un pH de 4,0 a 7,0: (A) una fructosil-péptido-oxidasa, (B) un reactivo para medir peróxido de hidrógeno, y (C) una enzima oxidante y de descomposición de glucosona.

La presente invención también proporciona un procedimiento para reducir el efecto de un compuesto de fructosil-lisina en el ensayo de proteína glicosilada contenida en una muestra, caracterizado porque comprende tratar una muestra que contiene la proteína glicosilada con una proteasa para así liberar fructosil-péptido o fructosil-aminoácido y hacer que actúen al menos los (A) a (C) siguientes sobre la liberación de fructosil-péptido o fructosil-aminoácido a un pH de 4,0 a 7,0: (A) una fructosil-péptido-oxidasa, (B) un reactivo para medir peróxido de hidrógeno, y (C) una enzima oxidante y de descomposición de glucosona.

Efectos de la invención

La presente invención proporciona un ensayo preciso de proteína glicosilada, fructosil-péptido o fructosil-aminoácido, a la vez que se reduce el efecto de compuestos de fructosil-lisina. El procedimiento según la presente invención puede realizarse mediante un simple operación y, por tanto, puede aplicarse a diversos procedimientos de análisis. Por tanto, el procedimiento de la presente invención es muy útil en pruebas clínicas.

Breve descripción del dibujo

[Fig. 1] La Fig. 1 muestra la correlación entre los valores de hemoglobina A1c (%) obtenidos del procedimiento de la presente invención (Ejemplo 5) y los valores de hemoglobina A1c (%) obtenidos de un procedimiento de referencia, además de la correlación entre los valores de hemoglobina A1c (%) obtenidos del procedimiento del Ejemplo comparativo 5 y los valores de hemoglobina A1c (%) obtenidos del procedimiento de referencia.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

No se impone particular limitación a la proteína glicosilada que va a ensayarse mientras que la proteína glicosilada se forme mediante unión no enzimática de una proteína con una aldosa tal como glucosa. Ejemplos de la proteína glicosilada incluyen hemoglobina glicosilada y albúmina glicosilada. De éstas se prefiere la hemoglobina glicosilada, especialmente hemoglobina A1c (HbA1c).

Ejemplos de una muestra biológica que contiene proteína glicosilada incluyen sangre completa, hemocitos, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, sudor, orina, líquido lagrimal, saliva, piel, mucosa y pelo. La proteína glicosilada también está contenida en una amplia gama de alimentos tales como zumo y condimentos. De éstas se prefiere sangre completa, hemocitos, suero y plasma. La muestra puede medirse como tal; es decir, sin someterse a ningún tratamiento. Alternativamente, antes de la medición, la muestra puede filtrarse o dializarse. Además, la proteína glicosilada que va a medirse puede someterse apropiadamente a concentración, extracción o dilución con agua o un tampón, que se describe más adelante en este documento.

En el procedimiento de la presente invención, en primer lugar, la proteína glicosilada se trata con una peptidasa para liberar fructosil-péptido o fructosil-aminoácido. No se impone limitación particular a la proteasa mientras que la proteasa tenga actividad de proteólisis o peptidólisis. Preferentemente se emplea una proteasa que pueda liberar eficientemente fructosil-péptido o fructosil-aminoácido (preferentemente fructosil-valilpéptido o fructosil-valina) en un corto periodo de tiempo. No se impone limitación particular al origen de la proteasa, y la proteasa puede derivarse de un microorganismo, un animal, una planta o similares. Ejemplos específicos de la proteasa incluyen reactivos comercialmente disponibles para fines de estudio tales como proteinasa K, tripsina, bromelaína, carboxipeptidasa, papaína, pepsina y aminopeptidasa; y reactivos comercialmente disponibles para uso industrial tales como proteinasa neutra, Toyozyme NEP (estas dos son productos de Toyobo, Ltd.), proteasa ácida, proteasa alcalina, Molsin, proteasa AO, peptidasa (estas cinco son productos de Kikkoman Corporation), Sumizyme CP, Sumizyme TP, Sumizyme LP50D (estas tres son productos de Shin Nihon Chemical Co., Ltd.), Thermoase PC10F, Protin PC, Protin PC10F, Protin PS10, Protin NY10, Protin NL10, Protin NC25 (estas siete son productos de Daiwa Kasei K.K.), Actinase AS (producto de Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.), Pronase E (producto de Roche), Umamizyme, proteasa S "Amano" G, proteasa A "Amano" G y proteasa P "Amano" 3G (estas cuatro son productos de Amano Enzyme Inc.). El efecto de la proteasa puede determinarse del siguiente modo: la proteasa se hace reaccionar con fructosil-péptido o similares, la proteína glicosilada o fructosil-péptido antes de la reacción y el producto resultante después de la reacción se someten a electroforesis capilar, y los resultados se analizan y se comparan entre antes y después de la reacción con la proteasa. La proteasa puede emplearse individualmente o en combinación de dos o más especies. La proteasa se deriva preferentemente de un microorganismo que pertenece al género *Bacillus*, *Aspergillus* o *Streptomyces*; o se produce a partir de un gen de un microorganismo tal; o pertenece a metaloproteínasa, proteasa neutra, proteasa ácida o proteasa básica. Ejemplos de enzimas derivadas del género *Bacillus* incluyen Protin PC10F, Protin NC25 (estas dos son productos de Daiwa Kasei K.K.) y Toyozyme NEP (producto de Toyobo, Ltd.). Ejemplos de las enzimas derivadas del género *Aspergillus* incluyen Molsin (producto de Kikkoman Corporation). Ejemplos de enzimas derivadas del género *Streptomyces* incluyen Actinase AS, Actinase AF, Actinase E (estas tres son productos de Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.) y proteasa tipo XIV (producto de Sigma). Estas enzimas pueden emplearse individualmente o en combinación (por ejemplo, combinación de proteinasa K y Toyozyme NEP, etc.).

No se impone limitación particular a la concentración de la enzima durante el uso real mientras que la proteasa pueda liberar eficientemente un fructosil-péptido libre de interés o un fructosil-aminoácido libre de interés. Una concentración apropiada de la proteasa puede determinarse experimentalmente considerando la actividad específica o un factor de la proteasa similar. Por ejemplo, la proteasa derivada del género *Aspergillus* (por ejemplo, Molsin, producto de Kikkoman Corporation) se añade en una concentración de 0,0001 a 50 mg/ml, preferentemente 0,001 a 20 mg/ml. El ajuste de pH para el tratamiento de la proteasa no se realiza necesariamente, pero el pH puede ajustarse a un valor que sea óptimo para la reacción de la enzima, dentro de un intervalo de 3,0 a 11,0. El ajuste de pH se lleva a cabo mediante el uso de un agente de regulación del pH adecuado tal como un tampón, que se describe más adelante en este documento. La temperatura de tratamiento es preferentemente 10 a 40°C.

No se impone limitación particular al tampón. Ejemplos del tampón incluyen tampones de fosfato, ftalato, citrato, Tris, maleato, succinato, oxalato, tartrato, acetato y de Good (MES, PIPES, ADA, etc.). No se impone limitación particular a la concentración de tampón. La concentración de tampón puede ser 0,00001 a 2 mol/l, preferentemente 0,001 a 1 mol/l.

Ejemplos de un fructosil-péptido libre o un fructosil-aminoácido libre que se obtienen mediante tratamiento de una muestra con una proteasa incluyen fructosil-valilhistidina y fructosil-valina. Una muestra biológica o un producto alimenticio antes de someterse a tratamiento con una proteasa ya contiene fructosil-péptido o fructosil-aminoácido, que se forma mediante la unión de glucosa al péptido o aminoácido libre liberado por la digestión de proteína glicosilada y por la transposición de Amadori del producto. Estos fructosil-péptido y fructosil-aminoácido también están incluidos en el fructosil-péptido o fructosil-aminoácido libre que se hace reaccionar con un enzima de ensayo.

El fructosil-péptido libre o fructosil-aminoácido libre puede ensayarse haciendo reaccionar un enzima de ensayo con fructosil-péptido o fructosil-aminoácido y entonces medir la sustancia obtenida de la reacción.

No se impone limitación particular a la enzima de ensayo que se hace reaccionar con fructosil-péptido o fructosil-aminoácido mientras que la enzima de ensayo sea una fructosil-péptido-oxidasa (documentos JP-A-2001-95598 y JP-A-2003-235585). La enzima puede derivarse de un microorganismo, un animal, una planta, etc., o puede ser genéticamente manipulada. Además, la enzima puede o puede no estar químicamente modificada. La enzima puede estar en forma de disolución o forma seca, y puede estar soportada sobre o unida a vehículo insoluble. La enzima puede usarse individualmente o en combinación de dos o más especies.

La cantidad de enzima empleada varía dependiendo del tipo de enzima. La enzima se emplea preferentemente en una cantidad de 0,001 a 1,000 U/ml, particularmente preferentemente 0,1 a 500 U/ml. La concentración de enzima puede determinarse experimentalmente apropiadamente considerando la actividad específica de la enzima. Las condiciones de pH bajo las que la enzima se hace reaccionar se determinan usando un tampón considerando el pH óptimo de la enzima, y se ajusta a pH 4,0 a 7,0, preferentemente pH 4,0 a 6,7, al que puede garantizarse el efecto de la presente invención. La temperatura de reacción puede seleccionarse apropiadamente de un intervalo de temperatura que se emplea generalmente en reacciones enzimáticas; por ejemplo, 10 a 40°C. Al igual que antes, no se impone limitación particular al tampón. Ejemplos del tampón incluyen tampones de fosfato, ftalato, citrato, Tris, maleato, succinato, oxalato, tartrato, acetato y de Good. De éstos se prefieren tampones de fosfato, citrato y ADA (ácido N-(2-acetamida)iminodiacético) debido a que garantizan una excelente estabilidad durante el almacenamiento de enzimas para la medición de fructosil-péptido o fructosil-aminoácido. No se impone limitación particular a la concentración de tampón, y la concentración es preferentemente 0,00001 a 2 mol/l, más preferentemente 0,001 a 1 mol/l.

Según las necesidades, la enzima anterior para la medición puede usarse en combinación con otra enzima, una coenzima, un reactivo productor de color oxidable, etc. Ejemplos de la enzima incluyen peroxidasa, diaforasa y enzimas metabolizantes de aminoácidos que no reaccionan con un sustrato, fructosil-valina. Alternativamente, una enzima tal como la ácido ascórbico-oxidasa o la bilirrubina-oxidasa puede emplearse para tratar otros componentes presentes en la sangre. Ejemplos de la coenzima incluyen nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD), nicotinamida-adenina-dinucleótido reducida (NADH), nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADP), nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducida (NADPH), tío-NAD y tío-NADP.

No se impone limitación particular al reactivo productor de color oxidable mientras que el reactivo productor de color oxidable se haga reaccionar con peróxido de hidrógeno para así revelar el color. Ejemplos incluyen una combinación de 4-aminoantipirina y un compuesto de fenol, un compuesto de naftol o un compuesto de anilina, y una combinación de 3-metil-2-benzotiazolinonahidrazona y un compuesto de anilina. Ejemplos del compuesto de fenol que pueden combinarse con 4-aminoantipirina incluyen fenol, p-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4-dibromofenol y 2,4,6-triclorofenol. Ejemplos del compuesto de anilina que pueden combinarse con 4-aminoantipirina incluyen N,N-dimetilanilina, N,N-di-etilanilina, N,N-dimetil-m-toluidina, N,N-di-etil-m-toluidina, N-etil-N-sulfopropil-m-toluidina, N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-toluidina (TOOS), N-etil-N-(3-metilfenil)-N'-acetiletilendiamina, 3-metil-N-etil-N-(hidroxietil)anilina, N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)anilina (ALOS), N-etil-N-(3-sulfopropil)anilina (ALPS), N,N-dimetil-m-anisidina y N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-anisidina (ADOS), etc. Otros ejemplos incluyen N-(carboximetilaminocarbonil)-4,4'-bis(dimetilamino)-difenilamina-sal de sodio (DA-64), 10-(carboximetilaminocarbonil)-3,7-bis(dimetilamino)-fenotiazina-sal de sodio (DA-67), 10-N-metilcarbamoil-3,7-dimetilamino-10H-fenotiazina (MCDP), N,N,N',N',N",N"-hexa-3-sulfopropil-4,4',4"-triaminotrifetilmetano (TPM-PS), diaminobencidina, ácido hidroxifenilpropiónico, tetrametilbencidina y ortofenilendiamina, etc.

Ejemplos de una sustancia producida mediante reacción de la enzima de ensayo con fructosil-péptido o fructosil-aminoácido incluyen péptido, peróxido de hidrógeno y glucosona, etc. El ensayo del fructosil-péptido o fructosil-aminoácido libre puede realizarse mediante medición de una sustancia producida tal. De los compuestos enumerados, el peróxido de hidrógeno se prefiere ya que la medición puede realizarse de una manera sencilla en un corto periodo de tiempo. El peróxido de hidrógeno puede determinarse mediante, por ejemplo, un procedimiento empleando un electrodo de oxígeno y un procedimiento enzimático empleando tanto una peroxidasa como una diaforasa y el agente colorante anterior, prefiriéndose el último.

Normalmente, la medición de peróxido de hidrógeno se lleva a cabo directamente después de la etapa de reacción de la enzima de ensayo con fructosil-péptido o fructosil-aminoácido para producir peróxido de hidrógeno. El pH de la disolución en la que va a medirse el peróxido de hidrógeno se ajusta con un tampón a un pH de 4,0 a 7,0, preferentemente 4,0 a 6,7. El grado del color desarrollado (cambio en absorbancia) se mide por medio de un espectrofotómetro y se compara con uno de un fructosil-péptido o fructosil-aminoácido patrón o similares que tiene una concentración conocida. Por tanto, puede determinarse la proteína glicosilada, fructosil-péptido o fructosil-aminoácido contenidos en una muestra.

El procedimiento para ensayar la proteína glicosilada según la presente invención incluye una etapa de liberar fructosil-péptido o fructosil-aminoácido libre y una etapa de medir la liberación de fructosil-péptido o fructosil-aminoácido libre. En la presente invención, estas etapas pueden realizarse por separado, o pueden realizarse en un único procedimiento; es decir, realizado seriadamente y directamente uno después del otro.

En el procedimiento para ensayar la proteína glicosilada según la presente invención, el pH de la mezcla de reacción

o la disolución que va a medirse se ajusta a 4,0 a 7,0, preferentemente a 4,0 a 6,7. Este ajuste reduce el efecto de la enzima de ensayo de fructosil-péptido o fructosil-aminoácido sobre compuestos de fructosil-lisina. Por tanto, el ajuste de pH para que se encuentre dentro del intervalo anterior es esencial en la etapa de medir fructosil-péptido o fructosil-aminoácido libre.

5 El reactivo para ensayar proteína glicosilada que proporciona efecto reducido de compuestos de fructosil-lisina incluye al menos (A) una proteasa, (B) una fructosil-péptido-oxidasa que produce peróxido de hidrógeno actuando sobre fructosil-péptido o fructosil-aminoácido a un pH de 4,0 a 7,0, y (C) un reactivo para determinar peróxido de hidrógeno. Además, la sensibilidad del ensayo puede potenciarse haciendo reaccionar la oxidasa descrita
10 anteriormente en (B) con fructosil-péptido o fructosil-aminoácido para producir glucosona y haciendo reaccionar una enzima oxidante y de descomposición de glucosona con la glucosona para así producir peróxido de hidrógeno (documento JP-A-2000-333696). La enzima oxidante y de descomposición de glucosona es preferentemente al menos una oxidasa seleccionada del grupo que consiste en glucosa-oxidasa, β -galactosidasa y piranosa-oxidasa. Las enzimas y los reactivos son como se han descrito anteriormente. Además, cuando se ensaya la hemoglobina glicosilada, especialmente la hemoglobina A1c, puede emplearse un agente de pretratamiento que libera hemoglobina de eritrocitos para proporcionar hemoglobina para el ensayo o un similar agente. Además, en el reactivo puede incorporarse una enzima para tratar impurezas contenidas en la sangre; un agente regulador de la reacción; un estabilizador para el reactivo; una sal tal como cloruro sódico, cloruro de potasio o ferrocianuro de potasio; una sal de tetrazolio para eliminar el efecto de una sustancia reductora; un antibiótico que sirve de
20 conservante; azida sódica; etc.

Ejemplos del agente de pretratamiento incluyen tensioactivos aniónicos y tensioactivos no iónicos (por ejemplo, Triton X-100) seleccionados de entre los derivados de polioxietileno. La cantidad de tensioactivo empleada es del 0,0001 al 10%, preferentemente del 0,001 al 1%, con respecto a la muestra, que según las necesidades se ha sometido a filtración, diálisis o a un tratamiento similar.
25

El reactivo para ensayar proteína glicosilada puede proporcionarse no sólo en forma de disolución, sino también en una forma seca o en forma de gel. El reactivo puede envasarse en un vial de vidrio, un recipiente de plástico, etc., o puede aplicarse a o impregnarse en un vehículo insoluble. Ejemplos del vehículo insoluble incluyen vehículos particulados/esféricos hechos de, por ejemplo, látex, vidrio y coloide; vehículos de placa plana hechos de, por ejemplo, semiconductor o vidrio; y vehículos similares a película o similares a filamento tales como aquellos hechos de papel o nitrocelulosa.
30

35 Ejemplos

La presente invención se describirá a continuación en más detalle mediante ejemplos que no deberán interpretarse como limitantes de la invención a ella misma.

40 [Ejemplo 1] Medición de fructosil-aminoácido

(1) Preparación de muestras

Se disolvieron individualmente fructosil-valina (fV), fructosil-valilhistidina (fVH) (estas dos son productos de BioQuest) y ϵ -fructosil-lisina (fK) (producto de Kikkoman Corporation) en 20 mmol/l de tampón de fosfato (pH 7,0) para preparar muestras (0,3 mmol/l cada una).
45

(2) Medición de muestras

Las muestras preparadas se midieron por medio de un analizador automático HITACHI 7150 según el siguiente procedimiento.
50

<Primer reactivo>

0,1 mol/l de tampón de fosfato

55 Ejemplo 1: pH 5,5, pH 6,0, pH 6,5, pH 7,0
Ejemplo comparativo 1: pH 7,5, pH 8,0

<Segundo reactivo>

60 5 U/ml de fructosil-péptido-oxidasa (FPOX-CE, producto de Kikkoman Corporation)
20 U/ml de peroxidasa (III) (producto de Toyobo, Ltd.)
1 mmol/l de N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-toluidina

65 (TOOS)
1 mmol/l de 4-aminoantipirina

0,1 moles de tampón de fosfato

Ejemplo 1: pH 5,5, pH 6,0, pH 6,5, pH 7,0

Ejemplo comparativo 1: pH 7,5, pH 8,0

5

El primer reactivo y el segundo reactivo emplearon el mismo pH para el ensayo.

10

Cada 240 µl del primer reactivo se añadieron a cada 20 µl de las muestras, y la mezcla resultante se incubó a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente se midió la absorbancia de la mezcla (absorbancia I). Después, el segundo reactivo (80 µl) se añadió adicionalmente a la misma, y la mezcla resultante se incubó a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente se midió la absorbancia de la mezcla (absorbancia II). La absorbancia se midió a la longitud de onda dominante de 546 nm y a la longitud de onda no dominante de 800 nm. El procedimiento anterior se repitió usando solución salina fisiológica en lugar de las muestras, y la mezcla resultante se empleó como control (reactivo que no contiene fV, fVH ni fK (denominado en lo sucesivo blanco de reactivo)). Para cada muestra, la diferencia entre la absorbancia I y la absorbancia II (valor de medición) se calculó por la siguiente ecuación A.

15

$$\text{Ecuación A: Diferencia en la absorbancia (valor de medición)} = \text{Absorbancia II} - (\text{Absorbancia I} \times (20 + 240) / (20 + 240 + 80))$$

20

A partir de los valores de medición obtenidos se calcularon los valores de fK/fV (relación de los valores de medición de muestras de ε-fructosil-lisina con respecto a los valores de medición de muestras de fructosil-valina) y los valores de fK/fVH (relación de los valores de medición de muestras de ε-fructosil-lisina con respecto a los valores de medición de muestras de fructosil-valilhistidina). Los valores de fK/fV y fK/fVH medidos a diversas condiciones de pH se compararon con los medidos a un pH de 8,0 (100%). Los resultados se muestran en la Tabla 1.

25

[Tabla 1]

pH de la mezcla de reacción	Ejemplo 1				Ejemplo comparativo 1	
	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Relación de valores de medición: fK/fV (%)	0,8	2,1	5,7	12,8	23,8	32,3
Porcentajes con respecto a fK/fV (pH 8,0) (%)	2,5	6,5	17,6	39,6	73,7	100,0
Relación de valores de medición: fK/fVH (%)	1,0	2,5	6,8	14,9	27,5	42,2
Porcentajes con respecto a fK/fVH (pH 8,0) (%)	2,4	5,9	16,1	35,3	65,2	100,0

30

Como es evidente de la Tabla 1, se encontró que tanto los valores de fK/fV como los valores de fK/fVH en el Ejemplo 1 eran considerablemente inferiores a los valores correspondientes en el Ejemplo comparativo 1, que reveló que el presente procedimiento proporcionó una especificidad potenciada por fV y fVH y una reactividad reducida por fructosil-lisinas.

[Ejemplo 2] Medición de fructosil-aminoácido

35

(1) Preparación de muestras

Similarmente al Ejemplo 1 se disolvieron individualmente fructosil-valilhistidina (fVH) (producto de BioQuest) y ε-fructosil-lisina (fK) (producto de Kikkoman Corporation) en 0,02 mol/l de tampón de fosfato (pH 7,0) para preparar muestras (0,3 mmol/l cada una).

40

(2) Medición de muestras

Las muestras preparadas se midieron por medio de un analizador automático HITACHI 7150 según el siguiente procedimiento.

45

<Primer reactivo>

Se empleó el primer reactivo en el Ejemplo 1.

50

<Segundo reactivo>

El segundo reactivo empleado en el Ejemplo 2 tenía la misma composición que la empleada en el Ejemplo 1, excepto que se cambiaron las 5 U/ml de fructosil-péptido-oxidasa (FPOX-CE) por 5 U/ml de fructosil-péptido-oxidasa (FPOX-EE).

55

El primer reactivo y el segundo reactivo emplearon el mismo pH para el ensayo.

El procedimiento del Ejemplo 1 se repitió. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

[Tabla 2]

pH de la mezcla de reacción	Ejemplo 3		Ejemplo comparativo 3
	5,5	6,5	8,0
(fV+fK) /fV (%)	101,6	106,2	138,0
(fVH+fK) /fVH (%)	101,7	108,8	141,6

5 Como es evidente de la Tabla 2, cuando se empleó fructosil-péptido-oxidasa (FPOX-EE) en lugar de fructosil-péptido-oxidasa (FPOX-CE) empleada en el Ejemplo 1 se encontró que los valores de fK/fVH eran considerablemente inferiores a los valores correspondiente en el Ejemplo comparativo 3, revelando que el presente procedimiento proporciona una especificidad potenciada por fructosil-valilhistidina y una reactividad reducida por fructosil-lisinas.

10

[Ejemplo 3] Medición de fructosil-aminoácido y fructosil-péptido

(1) Preparación de muestras

15

Se disolvieron individualmente fructosil-valina, fructosil-valilhistidina (estas dos son productos de BioQuest) y ϵ -fructosil-lisina (producto de Kikkoman Corporation) en 0,02 mol/l de tampón de fosfato (pH 7,0) para preparar disoluciones (0,6 mmol/l cada una). A una alícuota de cada una de las disoluciones de 0,6 mmol/l de fructosil-valina y a una alícuota de cada una de las disoluciones de 0,6 mmol/l de fructosil-valilhistidina se añadió una cantidad equivalente de 0,02 mol/l de tampón de fosfato (pH 7,0) para así preparar muestras 0,3 mmol/l de fructosil-valina y muestras 0,3 mmol/l de fructosil-valilhistidina. Por separado, a una alícuota de cada una de disoluciones 0,6 mmol/l de fructosil-valina y a una alícuota de disoluciones 0,6 mmol/l de fructosil-valilhistidina se añadió una cantidad equivalente de disolución 0,6 mmol/l de ϵ -fructosil-lisina que tenía la misma cantidad para así preparar muestras que contenían fructosil-valina (0,3 mmol/l) y ϵ -fructosil-lisina (0,3 mmol/l), y muestras que contenían fructosil-valilhistidina (0,3 mmol/l) y ϵ -fructosil-lisina (0,3 mmol/l).

25

(2) Medición de muestras

Las muestras preparadas se midieron por medio de un analizador automático HITACHI 7150 según el siguiente procedimiento.

30

<Primer reactivo>

Los reactivos (pH: 5,5, 6,5, y 8,0) se seleccionaron de entre los primeros reactivos empleados en el Ejemplo 1 y el Ejemplo comparativo 1 y se emplearon.

35

<Segundo reactivo>

Los reactivos (pH: 5,5, 6,5, y 8,0) se seleccionaron de entre los segundos reactivos empleados en el Ejemplo 1 y el Ejemplo comparativo 1 y se emplearon.

40

En cada muestra, el pH del primer reactivo fue el mismo que el del segundo reactivo.

De un modo similar al empleado en el Ejemplo 1 se calcularon los valores de (fV+fK)/fV (relación de valores de medición de muestras que contienen fructosil-valina y ϵ -fructosil-lisina con respecto a los valores de medición de muestras de fructosil-valina) y los valores de (fVH+fK)/fVH (relación de valores de medición de muestras que contienen fructosil-valilhistidina y ϵ -fructosil-lisina con respecto a los valores de medición muestras de fructosil-valilhistidina) y se evaluaron. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

45

[Tabla 3]

pH de la mezcla de reacción	Ejemplo 3		Ejemplo comparativo 3
	5,5	6,5	8,0
(fV+fK) /fV (%)	101,6	106,2	138,0
(fVH+fK) /fVH (%)	101,7	108,8	141,6

50

Como es evidente de la Tabla 3, se encontró que el efecto de ϵ -fructosil-lisina en el Ejemplo 3 era considerablemente inferior al de ϵ -fructosil-lisina en el Ejemplo comparativo 3.

[Ejemplo 4] Medición del % de hemoglobina A1c (HbA1c)

(1) Preparación de muestras

5 Se tomaron muestras de sangre completa mediante un procedimiento rutinario de 15 sujetos usando un tubo de recogida de sangre que contenía un EDTA anticoagulante. Las muestras de sangre completa así obtenidas se dejaron reposar en un cuarto frío durante la noche, por lo que se permitió que los eritrocitos precipitaran. Se muestreó una alícuota (10 µl) de cada una de los eritrocitos así precipitados. Posteriormente se añadió disolución Triton X-100 acuosa al 0,1% (300 µl) y se mezcló con los eritrocitos así muestreados (10 µl) para así preparar una muestra de hemolisis.

(2) Medición de muestras

15 Las muestras preparadas se midieron por medio de un analizador automático HITACHI 7150 según el siguiente procedimiento.

<Primer reactivo>

20 1 U/ml de proteinasa K
2 mmol/l de WST-3 (producto de Dojindo Laboratories)
0,02 mol/l de tampón de fosfato (pH 8,0)

<Segundo reactivo>

25 4 U/ml de fructosil-péptido-oxidasa (FPOX-CE, producto de Kikkoman Corporation)
20 U/ml de peroxidasa (III) (producto de Toyobo, Ltd.)
80 µmol/l de DA-64 (producto de Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)
7.500 U/ml de Toyozyme NEP (producto de Toyobo, Ltd.)* 37,5 mmol/l de NaCl
0,2 mol/l de tampón de fosfato (Ejemplo 4: pH 6,0, Ejemplo comparativo 4: pH 8,0)
30 *Antes de uso, Toyozyme NEP (100.000 U/ml) se dializó contra 20 mmol/l de tampón de fosfato (Ejemplo 4: pH 6,0, Ejemplo comparativo 4: pH 8,0) que contenía 500 mmol/l de NaCl a 4°C durante 4 horas.
**El pH final de la mezcla de reacción de la presente invención fue 6,7, y el de la mezcla de reacción del Ejemplo comparativo fue 8,0.

35 Cada 240 µl del primer reactivo se añadieron a cada 20 µl de las muestras, y la mezcla resultante se incubó a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente se midió la absorbancia de la mezcla (absorbancia III). El segundo reactivo (80 µl) se añadió a la misma, y la mezcla resultante se incubó a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente se midió la absorbancia de la mezcla (absorbancia IV). Para cada muestra se calculó la diferencia entre la absorbancia III y la absorbancia IV (diferencia = absorbancia V), que era atribuible a una cantidad de fructosil-péptido, usando la siguiente fórmula B.

$$\text{Ecuación B: Absorbancia V} = \text{Absorbancia IV} - (\text{Absorbancia III} \times (20 + 240) / (20 + 240 + 80))$$

45 La absorbancia III anterior es proporcional a la cantidad total de hemoglobina contenida en una muestra. Por tanto, la absorbancia III y la absorbancia V de la muestra se compararon con las obtenidas mediante el procedimiento anterior a partir de una disolución hemolizada de hemocitos que tenía un valor de hemoglobina A1c (%) conocido (hemoglobina A1c: 8,6%) para así calcular el valor de hemoglobina A1c (%) de la muestra. Los valores de hemoglobina A1c obtenidos en el Ejemplo 4 y el Ejemplo comparativo 4 se compararon con el obtenido mediante el uso de un kit comercialmente disponible "Rapidia A1c" (producto de Fujirebio Inc., basado en el procedimiento de látex) (procedimiento de referencia). Los resultados se muestran en la Tabla 4.

[Tabla 4]

Muestra nº	Valor de HbA1c (%)		
	Ejemplo 4	Ejemplo comparativo 4	Ejemplo de referencia
1	5,2	10,0	6,0
2	4,5	-17,0	5,8
3	5,4	-7,2	6,9
4	5,0	-4,4	5,7
5	4,5	-31,4	5,2
6	3,9	-22,4	4,7
7	4,4	-28,7	4,8

Muestra nº	Valor de HbA1c (%)		
	Ejemplo 4	Ejemplo comparativo 4	Ejemplo de referencia
8	5,5	-8,3	7,0
9	5,9	5,6	7,2
10	6,8	5,9	7,5
11	6,8	-2,9	8,4
12	9,1	49,1	8,8
13	8,2	23,9	8,7
14	8,9	27,1	9,6
15	11,5	11,5	11,5
Coeficiente de correlación	0,97	0,74	

Como es evidente de la Tabla 4, con el procedimiento del Ejemplo comparativo 4 resultaron valores de HbA1c negativos (%) poco realistas, mientras que los valores de HbA1c (%) obtenidos mediante el procedimiento según la presente invención presentaron buena correlación con los del procedimiento de referencia, como se compara con el Ejemplo comparativo 4. Estos resultados muestran que el procedimiento según la presente invención permite la determinación del valor de hemoglobina A1c (%) en una muestra, a la vez que previene el efecto de ϵ -fructosil-lisina o fructosil-lisil-péptido derivado de hemoglobina.

[Ejemplo 5] Medición del valor de hemoglobina A1c (%)

(1) Preparación de muestras

Se prepararon muestras de hemólisis de hemocitos a partir de 35 muestras de hemocitos humanos de un modo similar al empleado en el Ejemplo 4.

(2) Medición de muestras

Las muestras preparadas se midieron por medio de un analizador automático HITACHI 7150 según el siguiente procedimiento.

<Primer reactivo>

1 U/ml de proteinasa K
0,2% de Plysurf A208B (producto de DAI-ICHI KOGYO SEIYAKU Co., Ltd.)
0,02 mol/l de tampón de fosfato (pH 8,0)

<Segundos reactivos>

4 U/ml de fructosil-péptido-oxidasa (FPOX-CE, producto de Kikkoman Corporation)
20 U/ml de peroxidasa (III) (producto de Toyobo, Ltd.)
80 μ mol/l de TPM-PS (producto de Dojindo Laboratories)
7.500 U/ml de Toyozyme NEP (producto de Toyobo, Ltd.)*
37,5 mmol/l de NaCl

0,2 mol/l de tampón de fosfato (pH: 5,5, 6,0, 7,0 y 8,0)

*Antes de uso, cada Toyozyme NEP (100.000 U/ml) se dializó contra 20 mmol/l de tampón de fosfato (pH: 5,5, 6,0, 7,0 y 8,0 respectivamente) que contenía 500 mmol/l de NaCl a 4°C durante 4 horas.

Cada 240 μ l del primer reactivo se añadieron a cada 20 μ l de las muestras, y la absorbancia de las mezclas resultantes se midió a 600 nm (absorbancia VI) mediante la comparación con el blanco de reactivo, que se trata del mismo modo excepto que se empleó solución salina fisiológica en lugar de muestra. Posteriormente, estas muestras y el control se incubaron a 37°C durante 5 minutos, y el segundo reactivo (80 μ l) se añadió a la misma, seguido de incubación a 37°C durante 5 minutos. La absorbancia de cada una de las mezclas resultantes se midió a 600 nm empleando el blanco de reactivo como control (absorbancia VII). Se encontró que estas cuatro mezclas de reacción tenían un pH final de 6,4, 6,7, 7,2 y 8,0, respectivamente. Se calcularon los valores de hemoglobina A1c (%) de un modo similar al empleado en el Ejemplo 4. Por separado, como un ejemplo de referencia, los valores de hemoglobina A1c (%) de cada una de las mezclas de reacción se midieron usando el kit comercialmente disponible "RAPIDIA A1c" (producto de FUJIREBIO inc.) según las instrucciones del fabricante. La Fig. 1 muestra la correlación entre los valores de hemoglobina A1c (%) obtenidos del Ejemplo 5 y los obtenidos del procedimiento de referencia, y la correlación entre los valores de hemoglobina A1c (%) obtenidos del Ejemplo comparativo 5 y los obtenidos del

procedimiento de referencia. La Tabla 5 muestra los coeficientes de correlación entre los valores de hemoglobina A1c (%) obtenidos del presente procedimiento y los obtenidos del procedimiento de referencia, y los coeficientes de correlación entre los valores de hemoglobina A1c (%) obtenidos del Ejemplo comparativo 5 y los obtenidos del procedimiento de referencia, además de valores medios de porcentajes (% de sesgo) de la diferencia entre una medición del Ejemplo 5 o el Ejemplo comparativo 5 y una medición correspondiente del procedimiento de referencia, con respecto a la medición del procedimiento de referencia.

[Tabla 5]

	Ejemplo 5		Ejemplo comparativo 5	
pH final	6,4	6,7	7,2	8,0
Coefficiente de correlación	0,97	0,96	0,93	0,93
% medio de sesgo	-6,4	-8,6	-23,4	-17,9

10 El presente procedimiento de medición demostró estar muy de acuerdo con el procedimiento de referencia. Cuando se emplea el presente procedimiento, la hemoglobina A1c (%) en una muestra puede medirse sin verse afectada por el fructosil-lisilpéptido o las ϵ -fructosil-lisinas derivadas de hemoglobina.

15 **[Ejemplo 6]** Identificación de la estabilidad durante el almacenamiento de la enzima para la medición de fructosil-péptido o fructosil-aminoácido

(1) Preparación de la disolución de enzima

Las disoluciones de enzimas se prepararon mediante las siguientes disposiciones.

20 50 mmol/l de tampón (pH 6,0)*
 *Agentes tampón empleados: tres tampones de fosfato de potasio, citrato de sodio y ácido N-(2-acetamida)iminodiacético (ADA)
 5 U/ml de peroxidasa (III) (producto de Toyobo, Ltd.)
 25 1 U/ml de fructosil-péptido-oxidasa (FPOX-CE, producto de Kikkoman Corporation)

(2) Almacenamiento de la disolución de enzima

30 Los tres tipos de disoluciones de enzimas anteriormente preparadas se dejaron reposar a 4°C o 37°C durante la noche.

(3) Medición de la actividad enzimática de disoluciones de enzimas

35 La actividad enzimática de las disoluciones de enzimas se midió por medio de un analizador automático HITACHI 7170 según el siguiente procedimiento.

<Disolución de enzima diluida>

40 En la medición se usaron tres tipos de disoluciones de enzimas que se habían diluido 2 veces con 100 mmol/l de tampón de fosfato (pH 7,5).

<Primer reactivo para la medición de actividad enzimática >

45 0,5 mmol/l de N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-toluidina
 (TOOS)

50 0,5 mmol/l de 4-aminoantipirina
 1 U/ml de peroxidasa (III) (producto de Toyobo, Ltd.)
 100 mmol/l de tampón de fosfato (pH 7,5)

<Segundo reactivo para la medición de la actividad enzimática >

55 150 mmol/l de disolución acuosa de fructosil-glicina

Cada 182 μ l del primer reactivo para la medición de la actividad enzimática se añadieron a cada 6,5 μ l de las disoluciones de enzimas diluidas y la mezcla resultante se incubó a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente, cada 26 μ l de los segundos reactivos para la medición de la actividad enzimática se añadieron a la mezcla de reacción. Dos a tres minutos después de la adición del segundo reactivo se midió el cambio en absorbancia a 546 nm. Para la evaluación de la actividad se usó la relación, como se expresa en %, del cambio en la absorbancia obtenido de la

disolución de enzima que había sido incubada a 37°C al cambio en la absorbancia obtenido de la disolución de enzima que había sido incubada a 4°C (100%).

- 5 Se encontró que los valores de actividad relativos obtenidos mediante el uso de tampón de fosfato de potasio, tampón de citrato de sodio y tampón de ADA eran el 95%, 98% y el 89%, respectivamente, revelando que estos tampones son excelentes en la estabilidad durante el almacenamiento de la enzima de ensayo de fructosil-péptido o fructosil-aminoácido.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para reducir el efecto de un compuesto de fructosil-lisina en el ensayo de fructosil-péptido o fructosil-aminoácido, **caracterizado porque** comprende hacer que una fructosil-péptido-oxidasa actúe sobre fructosil-péptido o fructosil-aminoácido a un pH de 4,0 a 7,0 y medir el producto resultante a un pH de 4,0 a 7,0.
- 10 2. Un procedimiento para reducir el efecto de un compuesto de fructosil-lisina en el ensayo de una proteína glicosilada contenida en una muestra que contiene la proteína glicosilada, **caracterizado porque** comprende tratar la muestra con una proteasa para así liberar fructosil-péptido o fructosil-aminoácido libre, hacer que una fructosil-péptido-oxidasa actúe sobre la liberación de fructosil-péptido o fructosil-aminoácido a un pH de 4,0 a 7,0 y medir el producto resultante a un pH de 4,0 a 7,0.
3. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que la proteína glicosilada es hemoglobina glicosilada.
- 15 4. El procedimiento según la reivindicación 2 ó 3, en el que la proteasa se deriva de un microorganismo que pertenece al género *Bacillus*, *Aspergillus* o *Streptomyces* o se obtiene de un gen del microorganismo mediante una tecnología de recombinación de genes.
- 20 5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el fructosil-péptido es fructosil-valilhistidina.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el fructosil-aminoácido es fructosil-valina.
- 25 7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el producto es peróxido de hidrógeno.
- 30 8. Un procedimiento para reducir el efecto de un compuesto de fructosil-lisina en el ensayo de fructosil-péptido o fructosil-aminoácido, **caracterizado porque** comprende hacer que actúen al menos los (A) a (C) siguientes sobre fructosil-péptido o fructosil-aminoácido a un pH de 4,0 a 7,0
 (A) una fructosil-péptido-oxidasa,
 (B) un reactivo para medir peróxido de hidrógeno, y
 (C) una enzima oxidante y de descomposición de glucosona.
- 35 9. Un procedimiento para reducir el efecto de un compuesto de fructosil-lisina en el ensayo de proteína glicosilada contenida en una muestra, caracterizado porque comprende tratar la muestra con una proteasa para así liberar fructosil-péptido o fructosil-aminoácido y hacer que actúen al menos los (A) a (C) siguientes sobre la liberación de fructosil-péptido o fructosil-aminoácido a un pH de 4,0 a 7,0:
 (A) una fructosil-péptido-oxidasa,
 (B) un reactivo para medir peróxido de hidrógeno, y
 (C) una enzima oxidante y de descomposición de glucosona.
- 40 10. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que la proteína glicosilada es hemoglobina glicosilada.
- 45 11. El procedimiento según la reivindicación 9 ó 10, en el que la proteasa se deriva de un microorganismo que pertenece al género *Bacillus*, *Aspergillus* o *Streptomyces* o se obtiene de un gen del microorganismo mediante una tecnología de recombinación de genes.
- 50 12. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que el fructosil-péptido es fructosil-valilhistidina.
13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que el fructosil-aminoácido es fructosil-valina.

Fig. 1

