

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 802**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**C12Q 1/37** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09004588 .1**  
96 Fecha de presentación: **30.01.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2107376**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.10.2009**

54 Título: **Composición para el ensayo de proteínas glicosiladas**

30 Prioridad:  
31.01.2001 JP 2001022953  
16.02.2001 JP 2001039796  
08.08.2001 JP 2001240002

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**30.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**30.11.2012**

73 Titular/es:  
**ASAHI KASEI PHARMA CORPORATION (100.0%)**  
**1-105 Kanda Jinbo-cho Chiyoda-ku**  
**Tokyo 101-8101, JP**

72 Inventor/es:  
**KOUZUMA, TAKUJI;**  
**YOSHIOKA, ISSEI;**  
**ARAI, MOTOO;**  
**SUMITANI, JUNICHI y**  
**IMAMURA, SHIGEYUKI**

74 Agente/Representante:  
**DURÁN MOYA, Carlos**

ES 2 391 802 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

Composición para el ensayo de proteínas glicosiladas

5 Sector técnico

La presente invención se refiere a un método de ensayo de proteínas glicosiladas. El método de ensayo de proteínas glicosiladas de la presente invención se puede utilizar en exámenes clínicos y puede determinar proteínas glicosiladas de manera precisa.

10

Antecedentes de la técnica

15 La determinación de proteínas glicosiladas es muy importante en el diagnóstico y control de la diabetes. La hemoglobina glicosilada (GHb), que refleja un valor promedio de glucosa en sangre aproximadamente en los 1-2 meses anteriores, la albúmina glicosilada (GA), que refleja un valor promedio de glucosa en sangre aproximadamente en las dos semanas anteriores, la fructosamina (FRA), que generalmente indica proteínas glicosiladas que exhiben capacidad de reducción en el suero sanguíneo y similares, se miden a diario. La GHb es un producto glicosilado de la hemoglobina, es decir, el grupo  $\alpha$ -amino de la valina del extremo N en la cadena  $\beta$  de la hemoglobina está glicosilado. GA y FRA son productos glicosilados de albúmina y proteína de suero, respectivamente, es decir, el grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de lisina de la albúmina o de la proteína de suero sanguíneo está glicosilado.

20

25 Un método enzimático se considera como un método sencillo, fácil y barato para analizar con precisión proteínas glicosiladas. Las solicitudes de Patente Japonesas abiertas a Inspección Pública Núm. 6-46846, Núm. 5-192193, Núm. 2-195900, y Núm. 2-195899, y las Solicitudes de Patente Internacional Núm. WO 98/48043, y WO 97/13872 se indican como ejemplos de documentos que dan a conocer el método enzimático.

25

30 Sin embargo, para proporcionar una composición para analizar con precisión proteínas glicosiladas, es esencial 1) evitar el efecto de los componentes de globulinas y el ácido ascórbico y 2) estabilizar las proteasas, como mínimo, la enzima que reacciona con los aminoácidos glicosilados. Además, en el caso en el que la proteína glicosilada es una albúmina glicosilada, es importante 3) analizar con precisión la albúmina y 4) evitar el efecto de la hemoglobina glicosilada.

30

35 1) Métodos convencionales para evitar el efecto de los componentes de globulinas y el ácido ascórbico

35

Se conoce que la cantidad de globulinas de un diabético cambia y afecta al valor de FRA [Rodrigues, S. y otros, Clin. Chem. 35: 134-138 (1989)]. Se ha desarrollado un método para inhibir selectivamente la acción de una proteasa sobre los componentes de globulinas mediante la adición de un ión metálico específico y una proteína A o G a una solución de reacción de proteasas (Solicitud de Patente Japonesa Núm 11-231259). Las proteínas glicosiladas pueden analizarse sin ser afectadas por los componentes de globulina utilizando el método de la presente invención. Como inhibidor de proteasas selectivo para globulinas utilizado en el método, se mencionan metales, proteína A, y proteína G. Entre los metales especificados en esta solicitud de patente, son metales altamente eficaces los metales pesados, que pueden tener problemas de seguridad ambiental. Los metales menos eficaces pueden hacer que la solución de reactivos en enturbie si se combinan con otros reactivos (o composiciones). Además, la proteína A, y la proteína G son reactivos muy caros.

40

45

Como método para adsorber de forma selectiva globulina en sangre, es conocido un agente de tratamiento de la sangre que adsorbe endotoxinas y globulina en sangre utilizando el principio de la cromatografía y un copolímero de vinilo que introdujo un ligando que tiene un esqueleto de esteroide (Solicitud de Patente Japonesa abierta a Inspección Pública Núm. 61-94663). Sin embargo, los resultados mostrados en la Tabla 1 de los ejemplos de la Solicitud de Patente Japonesa abierta a Inspección Pública Núm. 61-94663 indican que sólo se confirmó que fueron adsorbidas  $\alpha$ 1-globulina y  $\alpha$ 2-globulina, pero la  $\gamma$ -globulina que representa el 70% o más de los componentes de globulina no fue adsorbida. Suponiendo que la gamma-globulina fuera adsorbida, no puede anticiparse la capacidad del agente de tratamiento de la sangre de inhibir la actividad de las proteasas sobre la  $\gamma$ -globulina.

50

55

Las ocasiones en que se ingiere una gran cantidad de ácido ascórbico como suplemento han aumentando en los últimos años. Las muestras clínicas que contienen ácido ascórbico a elevada concentración también han aumentado. El ácido ascórbico induce una variedad de efectos sobre los exámenes clínicos debido a la fuerte acción de reducción.

60

Como método para obviar los efectos del ácido ascórbico, es conocido un método de eliminación de forma química o enzimática del ácido ascórbico en muestras, utilizando una oxidasa de ácido ascórbico. Cuando se analizan los aminoácidos glicosilados, producidos por la fragmentación de las proteínas glicosiladas con una proteasa utilizando una enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado, es preferente un método de previa eliminación de ácido ascórbico, utilizando una oxidasa de ácido ascórbico (ASOx) en el momento de la reacción con una proteasa, en vista de un pequeño efecto sobre el sistema de coloración.

65

Como ejemplo de eliminación de ácido ascórbico en muestras utilizando ASOx en presencia de una proteasa, se ha informado de un experimento en el que se hace reaccionar ASOx con una solución de muestra en una solución tampón de ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]etano sulfónico (HEPES) a pH 8,0 (Clinical Chemistry, 27: 99-106, 1998). El informe describe que la capacidad de tratamiento del ácido ascórbico no cambió después de almacenamiento en frío durante dos semanas.

Sin embargo, la investigación realizada por los autores de la presente invención ha revelado que, cuando están presentes una solución tampón HEPES a pH 8,0, una proteasa y ASOx, la capacidad de tratamiento del ácido ascórbico se pierde casi en su totalidad en un día cuando se almacena a 37°C, o en dos semanas cuando se almacena a 10°C.

2) Técnica anterior para la estabilización de proteasas y enzimas que reaccionan, como mínimo, con un aminoácido glicosilado

Una solución de proteasas a una concentración inconcebiblemente alta, de un nivel que no se conoce en otro sector, tal como la industria alimentaria, se utiliza en el ensayo clínico de proteínas glicosiladas. Se conoce que las proteasas se auto-digieren en una solución acuosa. Es difícil suponer que una proteasa se mantiene estable en una solución acuosa a una concentración tan elevada. Por lo tanto, las proteasas utilizadas para una composición para analizar proteínas glicosiladas han sido suministradas como un producto liofilizado.

No se ha conocido ninguna composición para analizar proteínas glicosiladas, ni un método de ensayo de proteínas glicosiladas, en los que se establezca una proteasa en estado líquido y que sea almacenable durante un largo período de tiempo. Tampoco ha habido ninguna composición para analizar proteínas glicosiladas, ni un método de ensayo de proteínas glicosiladas, en los que la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado, se establezca en estado líquido y sea almacenable durante un largo período de tiempo.

3) Técnica anterior relacionada con un método para analizar albúmina con precisión

La inmunización con anticuerpos anti-albúmina y un método de tinción que utiliza verde de bromocresol (BCG), púrpura de bromocresol (BCP), o similares, se conocen como métodos para determinar la albúmina. El método de tinción es ampliamente utilizado en las inspecciones diarias debido a que es un procedimiento sencillo y de bajo coste. Aunque se ha confirmado el efecto del BCG sobre el componente de globulina, el BCG presenta la desventaja de una baja especificidad para la albúmina.

Por otro lado, el BCP es afectado fácilmente por sustancias que coexisten, a pesar de la alta especificidad para la albúmina. En particular, el BCP es afectado por compuestos SH, dando lugar a un problema de variación en los resultados del ensayo, según las condiciones de oxidación-reducción de la albúmina. Como un medio para resolver este problema, se ha propuesto un método en el que se hace reaccionar el BCP en presencia de un agente desnaturante de proteínas y/o un reactivo SH (Solicitud de Patente Japonesa abierta a Inspección Pública Núm. 10-232233). Sin embargo, no ha habido ejemplos en el estudio de la reactividad de BCP para GA y albúmina no glicosilada (NGA).

4) Técnica anterior para evitar el efecto de la hemoglobina glicosilada

Tal como se mencionó anteriormente, la GA se deriva de la albúmina por glicosilación del grupo  $\epsilon$ -amino, mientras que la GHb se obtiene por glicosilación del grupo  $\alpha$ -amino de la valina del extremo N en la cadena  $\beta$  de la hemoglobina. Por lo tanto, en el caso que se aplica GA como objeto de medición, es deseable determinar sólo los aminoácidos en los que ha sido glicosilado el grupo  $\epsilon$ -amino.

Aunque se conocen varias enzimas que muestran una alta especificidad para el grupo  $\epsilon$ -amino pero no tienen ninguna acción sobre la valina glicosilada (Solicitud de Patente Japonesa abierta a Inspección Pública Núm. 11-243950), ninguna de ellas está disponible a un coste lo suficientemente bajo para que las enzimas se utilicen en la práctica habitual. De estas enzimas, una oxidasa de fructosil aminoácido (FOD), derivada de *Fusarium oxysporum* posee elevada reactividad y es útil. Los presentes inventores han informado por separado el gen de FOD (Solicitud de Patente Japonesa abierta a Inspección Pública Núm. 10-201473). Aunque el proceso que utiliza el gen muestra una alta productividad y puede producir FOD a un bajo coste, la reactividad con la valina glicosilada, en la que se ha glicosilado el grupo  $\alpha$ -amino confirmado por los presentes inventores, no muestra una especificidad satisfactoria.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Para determinar proteínas glicosiladas con precisión, es esencial 1) evitar el efecto de los componentes de globulina y del ácido ascórbico y 2) estabilizar las proteasas y enzimas que reaccionan, como mínimo, con un aminoácido glicosilado. Además, cuando la proteína glicosilada es albúmina glicosilada, es esencial 3) determinar la albúmina de una forma precisa y 4) evitar el efecto de la hemoglobina glicosilada.

1) Método para evitar el efecto de los componentes de globulina y del ácido ascórbico

Los inventores de la presente invención han llevado a cabo extensos estudios y han descubierto que si uno o más miembros seleccionados del grupo que comprende ácido desoxicólico, amida de ácido desoxicólico, amida de ácido cólico, una sal de amonio cuaternario, un tensioactivo catiónico del tipo sal de amonio cuaternario, concanavalina A, octil glucósido y betaína, se añaden a una solución de reacción de proteasas, el efecto de una proteasa sobre los componentes de globulina pueden ser inhibidos de forma selectiva, y que si una enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado se hace reaccionar directamente con esta solución de reacción, se pueden determinar con precisión las proteínas glicosiladas de una manera simple y con una excelente reproducibilidad, sin inhibición del efecto enzimático. Estos compuestos son económicamente ventajosos, no tienen problemas ambientales y de seguridad en comparación con los métodos que utilizan tecnologías convencionales y no producen turbidez cuando se mezclan con las muestras.

La ASOx puede eliminar ácido ascórbico de manera eficiente. Sin embargo, normalmente es difícil suponer que la ASOx es estable en una solución de reacción que contiene una gran cantidad de proteasas. De hecho, según la investigación realizada por los inventores de la presente invención en relación con los tipos de proteasas, inhibidores de proteasas y tipos de ASOx, no se han descubierto condiciones en las que la ASOx es estable en una solución de reacción que contiene una gran cantidad de proteasas.

Sin embargo, como resultado de investigaciones dedicadas, los presentes inventores sorprendentemente han descubierto que la estabilidad de la ASOx aumenta significativamente según los tipos de soluciones también.

2) Estabilización de proteasas y enzimas que reaccionan, como mínimo, con un aminoácido glicosilado

Tal como se mencionó anteriormente, una solución de una proteasa se utiliza a una concentración de proteasa elevada en ensayos clínicos de proteínas glicosiladas. La propia proteasa se vuelve principalmente inestable en dicha solución. Sin embargo, como resultado de extensos estudios, los presentes inventores han descubierto que la estabilidad de las proteasas aumenta significativamente y las proteasas se pueden almacenar en una solución a altas concentraciones durante un largo período de tiempo si se añade dimetilsulfóxido, alcohol, sal de calcio soluble en agua, cloruro de sodio, una sal de amonio cuaternario, o un tensioactivo catiónico de tipo sal de amonio cuaternario.

Las enzimas que reaccionan, como mínimo, con un aminoácido glicosilado no son estables debido a que la actividad de las enzimas disminuye hasta aproximadamente un 10% de la actividad original, si se almacenan en estado líquido durante cuatro días a 37°C. Sin embargo, como resultado de extensos estudios, los presentes inventores han descubierto que si se añade un estabilizador seleccionado del grupo que comprende alcohol de azúcar, sacarosa, sal de magnesio soluble en agua, sal de calcio soluble en agua, sulfato de amonio, aminoácidos y sarcosina a una enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado, se puede obtener un efecto de estabilización sorprendentemente elevado en un nivel que casi no se observa disminución de la actividad cuando se almacena en estado líquido durante cuatro días a 37°C.

Además, aunque una proteasa muestra una alta actividad proteolítica cerca del pH óptimo, tiene lugar una reacción de autodigestión de las proteasas al mismo tiempo, lo que hace difícil almacenar la proteasa, en particular en estado líquido. Sin embargo, como resultado de extensos estudios, los presentes inventores han descubierto que las proteasas se pueden almacenar de manera estable sin verse afectadas por las condiciones durante el ensayo, proporcionando un primer reactivo formulado para inducir apropiadamente una reacción de las proteasas y un segundo reactivo formulado para estabilizar las proteasas en estado líquido. Los presentes inventores han descubierto, además, que es posible un ensayo preciso sin afectar la medición, incluso si se incorpora en el segundo reactivo una enzima que se utiliza para una reacción preliminar. Además, si se añade una enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado al primer reactivo, el aminoácido glicosilado en una muestra puede ser eliminado previamente y se puede ensayar de manera selectiva las proteínas glicosiladas.

3) Método de ensayo para determinar albúmina con precisión

Las investigaciones realizadas por los presentes inventores han revelado, de forma inesperada, que la reactividad de BPC con GA difiere de la reactividad de BPC con NGA y que, si está presente una gran cantidad de NGA, el valor analítico se ve afectado negativamente. Como resultado de extensos estudios, los presentes inventores han descubierto que la albúmina en una muestra que contiene una gran cantidad de NGA puede ser determinada con precisión mediante el tratamiento de la muestra con un agente desnaturalizante de proteínas y/o un compuesto que tiene un enlace S-S, antes o simultáneamente del ensayo para determinar la albúmina.

4) Cómo evitar el efecto de la hemoglobina glicosilada

Como resultado de extensos estudios sobre los problemas mencionados anteriormente, los presentes inventores han preparado una FOD mutante, mediante la modificación de un gen FOD originario de la cepa IFO-9972 de *Fusarium oxysporum* y se determinaron las propiedades de las FOD mutantes descubriendo que la especificidad por

el sustrato cambia notablemente mediante la sustitución de la lisina 372 del extremo N por otro aminoácido. Además, los presentes inventores han preparado varias FOD modificadas, que presentan solamente una reactividad extremadamente baja con la valina glicosilada y reacciona casi específicamente con la lisina glicosilada.

5 Estas FOD mutantes, que han sido descubiertas sobre la base de los descubrimientos mencionados anteriormente, han perdido la reactividad con la valina glicosilada mediante la sustitución de la lisina 372 en la secuencia de aminoácidos indicada en la Secuencia ID NO: 1 por otro aminoácido. Específicamente, estos son FOD mutantes según la reivindicación 1, que se obtienen mediante la sustitución de la lisina 372 en la secuencia de aminoácidos indicada en la Secuencia ID NO: 1 por triptófano, metionina o valina.

10 Por último, los inventores de la presente invención han conseguido una composición y un método para ensayar con precisión proteínas glicosiladas uniendo todos los resultados mencionados anteriormente.

15 La constitución y forma de realización preferente de la presente invención se describe con más detalle a continuación.

20 Se puede utilizar cualquier proteasa en la presente invención, siempre que la proteasa pueda reaccionar de forma eficaz con proteínas glicosiladas contenidas en las muestras y producir de forma eficaz aminoácidos glicosilados y/o péptidos glicosilados, originados a partir de las proteínas glicosiladas. Entre los ejemplos se incluyen proteasas obtenidas de animales, plantas y microorganismos tales como *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Lysobacter*, *Glifila*, levaduras, *Tritirachium*, *Thermus*, *Pseudomonas* y *Achromobacter*, y similares.

25 Cuando la proteína glicosilada a determinar mediante el ensayo es GA, son preferentes proteasas obtenidas de microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* o *Streptomyces*, debido a la elevada reactividad con la albúmina humana (Alb). Cuando la proteína glicosilada a determinar mediante el ensayo es GHb, son preferentes proteasas obtenidas de microorganismos pertenecientes al género *Bacillus*, *Aspergillus*, *Streptomyces* o *Tritirachium*, debido a la elevada reactividad con la hemoglobina humana (Hb).

30 En la presente invención, la actividad de la proteasa se puede medir como sigue.

< Método para medir la actividad de la proteasa >

35 La actividad de una proteasa que exhibe un cambio de color correspondiente a 1 µg de tirosina en un minuto a 30°C en las siguientes condiciones, se indica como 1 PU (unidad proteolítica).

Sustrato	Caseína de leche al 0,6% (fabricada por Merck & Co., Inc.)
Solución de enzima	Diluída a 10-20 PU
Solución de dilución de enzima	Solución tampón de ácido acético 20 mM (pH 7,5), acetato de calcio 1 mM, cloruro de sodio 100 mM
Solución de terminación de la reacción	Ácido tricloroacético 0,11 M, acetato sódico 0,22 M, ácido acético 0,33 M

<Procedimiento>

40 Se disolvió una solución de proteasa en una solución de dilución de enzima para obtener una concentración de 10-20 PU/ml. Se cargó 1 ml de esta solución en un tubo de ensayo y se calentó a 30°C. Se añadieron 5 ml de una solución de sustrato previamente calentada a 30°C. Exactamente 10 minutos después, se añadieron 5 ml de una solución de terminación de reacción para terminar la reacción. La mezcla se calentó a 30°C durante 30 minutos para provocar que el precipitado sedimente. La mezcla se filtró a través de un filtro Toyo No. 131 (9 cm) para obtener un filtrado.

45 Para el ensayo en blanco, se calentó 1 ml de la solución de proteasa a 30°C en un tubo de ensayo, se añadieron 5 ml de la solución de terminación de reacción, a continuación, se añadieron 5 ml de la solución de sustrato, después de lo cual el precipitado sedimentó y se filtró en de la misma manera. Se añadieron 5 ml de solución de carbonato de sodio 0,55 M y 1 ml de reactivo de Folin diluido 3 veces a 2 ml del filtrado. Después de la reacción a 30°C durante 30 minutos, se midió la absorbancia a 660 nm. El cambio de absorbancia se determinó restando la absorbancia del blanco de la absorbancia de la muestra que reaccionó con la enzima. A continuación, se determinó la actividad enzimática utilizando una curva de actividad estándar preparada por separado.

55 <Preparación de la curva de actividad estándar>

Una solución de enzima ajustada a una concentración de aproximadamente 50 PU/ml se diluyó para preparar varias soluciones de enzimas con una serie de aumento de la dilución a una concentración de 2-50 PU/ml. El procedimiento anterior se aplicó a cada solución de enzima. El cambio de absorbancia resultante se trazó en el eje vertical y el aumento de la dilución se representó en el eje horizontal. Por otro lado, se preparó una solución de tirosina estándar (concentración de tirosina: 9,09 µg/ml) disolviendo L-tirosina en solución de ácido clorhídrico 0,2 N

para obtener una concentración de 0,01% y la adición de 10 ml de solución de ácido clorhídrico 0,2 N al 1 ml de la solución de L-tirosina. El procedimiento de medición anterior se aplica a 2 ml de la solución de tirosina estándar y 2 ml de solución de ácido clorhídrico 0,2 N. El cambio de absorbancia resultante corresponde a 18,2 µg de tirosina. El cambio de absorbancia se representa en el gráfico anterior. El punto de intersección de una línea vertical, desde el punto trazado y el eje horizontal corresponde a 10 PU/ml.

Estas proteasas se pueden utilizar en cualquier concentración en la que las proteínas diana pueden ser eficazmente digeridas en un período de tiempo especificado, habitualmente en el intervalo de 1-100,000 PU/ml y, preferentemente de 10-10,000 PU/ml, por ejemplo.

Como la enzima capaz de reaccionar, como mínimo, con un aminoácido glicosilado que se puede utilizar en la presente invención, se puede utilizar cualquier enzima que pueda reaccionar de forma eficaz con un aminoácido glicosilado o un péptido glicosilado producido a partir de una proteína glicosilada, contenidos en una solución de muestra y que sustancialmente pueda determinar mediante ensayo la proteína glicosilada por el efecto de las proteasas. Por ejemplo, puede tratarse de una enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado, que reacciona de forma eficaz con aminoácidos en los que el grupo α-amino está glicosilado, una enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado, que reacciona de forma eficaz con aminoácidos en los que el grupo ε-amino está glicosilado.

Entre los ejemplos de la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado, que reacciona de forma eficaz con aminoácidos en los que el grupo ε-amino está glicosilado, se encuentran FOD derivadas de microorganismos pertenecientes al género *Gibberella*, *Aspergillus*, *Candida*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Acremonium*, o *Debaryomyces*.

Entre los ejemplos de la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado, que reacciona de forma eficaz con aminoácidos en los que el grupo α-amino está glicosilado, se encuentran enzimas derivadas de microorganismos pertenecientes al género *Corynebacterium*.

Además, entre los ejemplos de la enzima que tiene una actividad suficiente en presencia de una proteasa y se pueden preparar a bajo coste, se encuentra una quetoamina oxidasa producida por recombinación génica (R-FOD fabricado por Asahi Kasei Corporation) y una FOD de tipo mutante (R-FOD-II, fabricado por Asahi Kasei Corporation) con reactividad extremadamente reducida con la valina glicosilada.

El ADN que codifica la proteína FOD derivada de la cepa IFO-9972 de *Fusarium oxysporum* a partir de la que se produce R-FOD-II puede obtenerse mediante extracción del ADN cromosómico de la cepa IFO-9972 de *Fusarium oxysporum* por un método convencional y la separación del ADN que codifica la proteína FOD por el método de PCR o método de hibridación.

Para introducir una mutación en el gen FOD obtenido, se puede emplear el método de PCR o mutagénesis dirigida al sitio, si el ADN es mutado directamente. Si se emplea la mutación accidental, se puede utilizar una *Escherichia coli* deficiente de reparación del ADN como un huésped o se puede cultivar un microorganismo huésped con un gen FOD introducido, en un medio que contiene una fuente de mutación de ADN.

El gen FOD mutante, obtenido de esta manera, se introduce en un microorganismo huésped utilizando un sistema huésped-vector adecuado. Un microorganismo que tiene un plásmido de ADN recombinante que contiene el gen FOD es separado por cribado, utilizando un marcador para el vector de expresión, y la expresión de la actividad de FOD o una sonda de ADN como un índice. La FOD mutante se puede obtener mediante el cultivo del microorganismo genéticamente recombinante, extrayendo la proteína recombinante del microorganismo y purificando la proteína.

Un método específico para la obtención de la FOD mutante es el siguiente. En el siguiente procedimiento, el método convencional incluye, por ejemplo, el método de Maniatis y col. (Maniatis, T., y otros. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory 1982, 1989) o un método descrito en los manuales adjuntos a diversas enzimas y kits comercialmente disponibles.

Para introducir un mutante en el gen FOD separado, se puede utilizar un método de PCR utilizando una polimerasa deficiente de reparación 3' → 5', tal como una polimerasa Taq, en condiciones en las que se añade un ion manganeso. De forma alternativa, se puede utilizar un método de introducción del gen FOD en un huésped de *Escherichia coli* deficiente de reparación del ADN, cultivando el microorganismo huésped en un medio que contiene una fuente mutante, tal como dianisidina, para inducir una mutación génica y separar el mutante adquiriendo la especificidad por el sustrato diana de las cepas candidatos mutantes producidas.

La mutación FOD introducida utilizando los métodos mencionados anteriormente se puede confirmar mediante la determinación de la secuencia de bases del gen en el que se ha introducido el mutante por el método dideoxi (Sanger, F. (1981) Science, 214, 1205-1210).

Una vez que se ha determinado la mutación, también se puede introducir la mutación específica mediante mutagénesis dirigida al sitio, utilizando el método de Zoller y otros (Zoller, M.J. y Smith, M. (1983), *Methods in Enzymology*, 154, 367).

- 5 La mutación de la secuencia de aminoácidos del polipéptido que forma la FOD mutante se puede determinar a partir de la secuencia de bases del gen mutante. La FOD mutante obtenida por el método mencionado anteriormente puede ser producida como un recombinante mediante la incorporación del gen FOD mutante en un sistema huésped-vector adecuado.
- 10 Como vectores en los que se incorpora el gen FOD mutante, son apropiados vectores contruidos para utilizar en recombinación de genes a partir de un fago o plásmido que puede crecer de forma autónoma en un microorganismo huésped. Como vectores de fago, cuando se utiliza un microorganismo que pertenece a *E. coli* como microorganismo huésped se pueden utilizar, por ejemplo,  $\lambda$ gt- $\lambda$ C,  $\lambda$ gt- $\lambda$ B, y similares. Como vectores de plásmido, cuando se utiliza *E. coli* como microorganismo huésped, se utilizan preferentemente, por ejemplo, los plásmidos pBR322, pBR325, pACYC184, pUC12, pUC13, pUC18, pUC19, pUC118, pIN I, y Bluescript KS+; cuando se utiliza *Bacillus subtilis* como microorganismo huésped, se pueden utilizar pUB110 y pKH300PLK; cuando se utiliza *Actinomyces* como microorganismo huésped, se pueden utilizar pIJ680 y pIJ702; y cuando se utiliza levadura, particularmente *Saccharomyces cerevisiae*, como microorganismo huésped, se pueden utilizar Yrp7, pYC1, y Yep3.
- 15
- 20 Para incorporar un gen FOD mutante en el vector obtenido de esta manera, se digieren el vector y el gen FOD mutante con una endonucleasa de restricción adecuada, que puede producir los mismos terminales y fragmentos de ADN que contienen el gen FOD mutante y se combinan los fragmentos de vector utilizando una ADN ligasa, según un método convencional.
- 25 Cualquier microorganismo puede ser utilizado como microorganismo huésped, en el que se transfiere el vector combinado con el gen FOD mutante, siempre que un ADN recombinante pueda crecer de forma estable y autónoma. Cuando el microorganismo huésped es un microorganismo que pertenece a *E. coli*, se pueden utilizar, por ejemplo, *E. coli* DH1, *E. coli* JM109, *E. coli* W3110, *E. coli* C600 y similares. Cuando el microorganismo huésped es un microorganismo que pertenece a *Bacillus subtilis*, se puede utilizar *Bacillus subtilis* ISW1214 y similares. Cuando el
- 30 microorganismo huésped es un microorganismo que pertenece a *Actinomyces*, se puede utilizar *Streptomyces lividans* TK24 y similares. Cuando el microorganismo huésped es un microorganismo que pertenece a *Saccharomyces cerevisiae*, se puede utilizar *Saccharomyces cerevisiae* INVSC1 y similares.
- 35 Como método para incorporar ADN recombinante en el microorganismo huésped, cuando el microorganismo huésped pertenece a *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Streptomyces lividans*, por ejemplo, el ADN recombinante se puede transferir a los microorganismos huésped transformados en células competentes, según un método convencional. Se puede aplicar la electroporación en función del tipo de cepa.
- 40 Para preparar una mutante, se puede emplear un método de cultivo del microorganismo huésped, en el que el gen FOD mutante ha sido introducido en un medio apropiado, recoger las células cultivadas, destruir las células mediante pulverización ultrasónica en una solución tampón apropiada o mediante un tratamiento con lisozima para preparar el extracto de células. Es posible añadir una secuencia señal para provocar la expresión por secreción, en la que la FOD mutante se acumula en el caldo de cultivo.
- 45 La FOD mutante producida de este modo se separa y se purifica mediante precipitación con sulfato amónico convencional, filtración en gel, purificación en columna, y similares, y se suministra como una preparación enzimática.
- 50 Los componentes se utilizan comúnmente en la técnica de manipulación génica mencionada anteriormente en una proporción, por ejemplo, aproximadamente de 1-10 U de la endonucleasa de restricción, aproximadamente de 300 U de ligasa y aproximadamente de 1-10 U de otras enzimas para 0,1- 10  $\mu$ g de ADN y ADN del vector del microorganismo fuente.
- 55 Como ejemplos específicos de microorganismo transgénico que comprende el gen FOD mutante y capaz de producir la FOD mutante, se pueden mencionar *Escherichia coli* JM109-pcmFOD3 (FERM BP-7847), un microorganismo transgénico que tiene un microorganismo que pertenece a *Escherichia coli* como microorganismo huésped y que posee un plásmido pcmFOD3 que contiene el gen FOD mutante en el mismo, *Escherichia coli* JM109-pcmFOD4, un microorganismo transgénico que posee pcmFOD4 y *Escherichia coli* JM109-pcmFOD5 (FERM BP-7848), un microorganismo transgénico que posee pcmFOD5. Las estructuras de estos plásmidos se muestran en la figura 7.
- 60
- 65 La *Escherichia coli* JN109-pcmFOD3 y la *Escherichia coli* JM109:pcmFOD5 fueron depositadas en el Depósito del Organismo Internacional de Patentes, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, Institución Administrativa Independiente (Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japón) el 16 de enero de 2001, con el número de depósito FERM BP-7847 y FERM BP-7848, respectivamente.

## ES 2 391 802 T3

5 En la preparación de la FOD mutante a partir del microorganismo transgénico, el microorganismo transgénico se cultiva en un medio nutritivo para provocar que la FOD mutante que se produzca en las células o en el caldo de cultivo, se recogen las células mediante filtración o centrifugación del caldo de cultivo una vez finalizado el cultivo, se destruyen las células mediante medios mecánicos o medios enzimáticos, utilizando lisozima o similares, opcionalmente se condensa la solución acuosa de la FOD mutante mediante la adición de EDTA y/o un tensioactivo adecuado y se purifica el condensado o la solución acuosa no condensada mediante fraccionamiento con sulfato amónico, filtración en gel, cromatografía de adsorción, tales como cromatografía de afinidad o cromatografía de intercambio iónico, obteniendo de este modo FOD mutante de alta pureza.

10 Las condiciones de cultivo para los microorganismos transgénicos se seleccionan teniendo en cuenta las propiedades nutritivas y fisiológicas del microorganismo. Habitualmente, se emplean las condiciones de cultivo líquido en muchos casos. Sin embargo, la agitación aireada profunda es ventajosa para la producción industrial. Como fuentes nutritivas del medio de cultivo, se pueden utilizar fuentes nutritivas comúnmente utilizadas en la incubación de microorganismos.

15 Se puede utilizar como fuente de carbono cualquier compuesto hidrocarbonado utilizable tal como glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa, fructosa y melaza. Se puede utilizar como fuente de nitrógeno cualquier compuesto nitrogenado utilizable tal como peptona, extracto de carne, extracto de levadura e hidrolizado de caseína.

20 Se añaden, en caso necesario, otros componentes que incluyen sales tales como fosfato, carbonato, sulfato, sal de magnesio, sal de calcio, sal de potasio, sal de hierro, sal de manganeso y sal de zinc, aminoácidos específicos y vitaminas específicas.

25 La temperatura de cultivo se puede variar de forma adecuada en el intervalo en el que el microorganismo puede crecer y producir la FOD mutante. En el caso de *E. coli*, el intervalo de temperatura preferente es de aproximadamente 20-42°C. Aunque el tiempo de cultivo puede variar algo según las condiciones de cultivo, el cultivo se puede interrumpir en un momento apropiado, cuando la producción de la FOD mutante alcanza el máximo. En el caso de *E. coli*, el tiempo de cultivo es habitualmente de 12-48 horas. El pH del medio de cultivo se puede variar de forma adecuada en el intervalo en el que el microorganismo puede crecer y producir la FOD mutante. En el caso de *E. coli*, el intervalo de pH preferente es aproximadamente un pH de 6-8.

30 La FOD mutante en el medio de cultivo se puede utilizar mediante la recogida del medio de cultivo que contiene las células como tal. Sin embargo, habitualmente, cuando la FOD mutante está contenida en el caldo de cultivo, se utiliza una solución que contiene la FOD mutante separada de las células del microorganismo mediante filtración o centrifugación. Cuando la FOD mutante está dentro de las células, se recogen las células del caldo de cultivo resultante mediante filtración, centrifugación u otros medios, las células recogidas opcionalmente se destruyen mediante medios mecánicos o medios enzimáticos utilizando lisozima o similar, y la FOD mutante se disuelve en agua, después de añadir un agente quelante tal como EDTA y/o un tensioactivo para seleccionar y recoger la FOD mutante como una solución acuosa.

35 La solución que contiene la FOD mutante, obtenida de esta manera, se condensa a presión reducida o mediante filtración a través de una membrana, a continuación, la FOD mutante es precipitada mediante precipitación fraccionada por un tratamiento de precipitación salina con sulfato de amonio, sulfato sódico, o similares

40 A continuación, el precipitado se disuelve en agua y se dializa a través de una membrana semipermeable para eliminar impurezas de bajo peso molecular. Alternativamente, la solución que contiene la FOD mutante se puede purificar mediante filtración en gel utilizando un adsorbente, un agente de filtración en gel, o similar, cromatografía de adsorción tal como cromatografía de afinidad o cromatografía de intercambio iónico. La solución que contiene la FOD mutante obtenida por estos medios se concentra a presión reducida, se liofiliza o se procesa de otro modo para proporcionar FOD mutante purificada.

45 La actividad de la enzima que reacciona con el aminoácido glicosilado se midió utilizando el método siguiente.

50 < Método para medir actividad de la enzima que reacciona con el aminoácido glicosilado >

55 < Composición de la solución de reacción >

50 mM	Tampón Tris (pH 7,5)
0,03%	4-aminoantipirina (4-AA) (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)
0,02%	Fenol (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)
4,5 U/ml	Peroxidasa (POD) (fabricada por Sigma-Aldrich)
1,0 mM	$\alpha$ -carbобензоxi- $\epsilon$ -D-1-desoxi-fructosil lisina o 1-desoxi-fructosil valina (sintetizados y purificados según el método de Hashiba y otros (Hashiba, H. y otros, J. Agric. Food Chem., 24; 70, 1976. En lo sucesivo abreviados, respectivamente, como "ZFL" y "FV")

## ES 2 391 802 T3

Se colocó 1 ml de la solución de reacción anterior en un pequeño tubo de ensayo y se precalentó a 37°C durante 5 minutos, a continuación se añadieron 0,02 ml de una solución de enzima de forma adecuada. La mezcla se agitó para iniciar la reacción. Después de la reacción durante exactamente 10 minutos, se añadieron 2 ml de SDS al 0,5% para terminar la reacción. Se midió la absorbancia (As) a una longitud de onda de 500 nm. Como ensayo en blanco, se siguió el mismo procedimiento utilizando 0,02 ml de agua destilada en lugar de la solución de enzima para medir la absorbancia (Ab). La actividad enzimática se determinó a partir de la diferencia (As-Ab) entre la absorbancia (As) después de la reacción enzimática y la absorbancia del ensayo en blanco (Ab). La correlación entre la absorbancia y el peróxido de hidrógeno producido se determinó previamente utilizando una solución estándar de peróxido de hidrógeno. La cantidad de enzima que puede producir 1 μmol de peróxido de hidrógeno a 37°C en un minuto se define como 1 U. La fórmula de cálculo se muestra a continuación.

$$\text{Actividad enzimática (U/ml)} = [(As-Ab) / 12,0] \times [3,02/0,02] \times [1/10] \times [2/B]$$

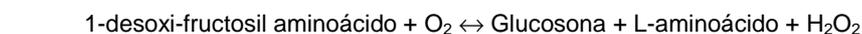
3,02: solución de reacción total (ml)  
0,02: solución enzimática total (ml)  
10: tiempo de reacción  
2: un coeficiente que indica la producción de una molécula de una materia colorante en la que 4-AA y fenol se condensan a partir de dos moléculas de peróxido de hidrógeno  
12,0: coeficiente de absorbancia (mM) 4-AA-fenol  
B: aumento de dilución de la solución enzimática

Entre las FOD mutantes obtenidas por el método mencionado anteriormente, la FOD mutante, en la que la lisina 372 en la secuencia de aminoácidos indicada en la Secuencia ID NO: 1 se sustituye por triptófano, tiene las siguientes propiedades enzimáticas.

(1) Especificidad de sustrato  
ZFL 100%  
FV 0%

(2) Reacción enzimática

La enzima cataliza la reacción, como mínimo de descomposición de un compuesto de Amadori de aminoácido-α o aminoácido-ε para producir glucosona, peróxido de hidrógeno y los correspondientes aminoácidos-α o aminoácidos-ε, tal como se muestra en la siguiente fórmula de reacción.



(3) Peso molecular

El peso molecular de la enzima, determinado por el método de permeación en gel en columna utilizando una columna Sephadex G-100 y un eluato de tampón fosfato de 0,1 M (pH 7,0) que contenía NaCl 0,2 M, fue de 48.000 ± 2.000. El resultado obtenido mediante SDS-PAGE fue de 47.000 ± 2.000.

(4) Punto isoelectrico

El punto isoelectrico, determinado mediante el fraccionamiento de la enzima después de aplicar un voltaje constante de 700 V durante 40 horas a 4°C en una electroforesis de enfoque utilizando anfolita como portador, seguido por la medición de la actividad enzimática de cada fracción, fue de pH 4,3 ± 0,2.

(5) Valor de Km

El valor de Km para un sustrato sintético ZFL, determinado mientras se cambia la concentración de ZFL en una solución de reacción que contiene solución tampón de Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), 4-AA al 0,03%, fenol al 0,02% y peroxidasa 4,5 U/ml, fue de 3,4 mM.

(6) pH óptimo

La actividad enzimática se midió según el método mencionado anteriormente para determinar la actividad de la enzima, excepto que se utilizaron solución tampón de acetato 100 mM (pH 4,4-5,4), solución tampón de fosfato (pH 5,6-7,9), solución tampón de Tris-HCl (pH 7,3-8,5), o solución tampón de glicina-hidróxido de sodio (pH 8,0-10,3) para la solución de reacción, en vez de solución tampón de Tris-HCl 50 mM (pH 7,5). Como resultado, la enzima mostró actividad máxima a pH 7,5.

(7) Estabilidad del pH

Se incubaron 0,5 ml de las diferentes soluciones tampón que contenían 0,5 U de la enzima, cada una utilizada para

la determinación del pH óptimo a una concentración de 0,5 M, a 40°C durante 10 minutos, y, a continuación, se determinaron estas actividades residuales, según el método de medición de actividad que se describe a continuación. Como resultado, se encontró que la enzima mantiene un 80% o más de actividad a pH 7,0-9,0.

5 (8) Estabilidad térmica

Se preparó una solución de enzima de 0,5 U utilizando solución tampón de Tris-HCl 0,2 M (pH 7,5) y se calentó durante 10 minutos y se determinó la actividad residual según el método de medición de actividad. Como resultado, se encontró que la enzima mantiene un 95% o más de actividad hasta 40°C.

10

(9) Temperatura óptima

15 La enzima se hizo reaccionar, según el método de medición de actividad, utilizando solución tampón de Tris-HCl 40 mM (pH 7,5) a diferentes temperaturas. Después de la reacción durante 10 minutos, se añadieron 2 ml de lauril sulfato de sodio 0,5% (en lo sucesivo indicado como "SDS") para terminar la reacción. Se midió la absorbancia (As) a una longitud de onda de 500 nm. Como resultado, la enzima mostró la actividad máxima a 50°C.

20 A continuación, se hace referencia a un método para medir la valina glicosilada en una muestra, utilizando una FOD que tiene una reactividad con la valina glicosilada, después de eliminar la lisina glicosilada en la solución de la muestra utilizando una FOD mutante con una reactividad muy reducida con la valina glicosilada, obtenida mediante la sustitución de la lisina 372 en la secuencia de aminoácidos indicada en la Secuencia ID NO: 1 por otro aminoácido.

25 Se puede utilizar cualquier FOD que no tenga reactividad con la valina glicosilada para eliminar la lisina glicosilada en una solución de la muestra. Por ejemplo, se utiliza una FOD mutante con una reactividad muy reducida con la valina glicosilada obtenida mediante la sustitución de la lisina 372 en la secuencia de aminoácidos indicada en la Secuencia ID NO: 1 por otro aminoácido. Entre las FOD mutantes, se utiliza preferentemente la FOD mutante, en la que la lisina 372 en la secuencia de aminoácidos indicada en la Secuencia ID NO: 1 se sustituye por cualquiera entre triptófano, metionina y valina. La cantidad de enzima añadida a la solución de reacción puede ser una cantidad suficiente para eliminar la lisina glicosilada en la solución de la muestra, por ejemplo, de 0,5-200 U/ml, y más preferentemente de 1-50 U/ml.

35 No existen limitaciones de la FOD para la medición de la valina glicosilada, siempre que la FOD pueda reaccionar con la valina glicosilada. Por ejemplo, se puede utilizar la FOD que se obtiene de la cepa IFO-9972 de *Fusarium oxysporum*. La cantidad de la enzima añadida a la solución de reacción puede ser una cantidad suficiente para medir la valina glicosilada en la solución de la muestra, por ejemplo, de 0,5-200 U/ml, y más preferentemente de 1-50 U/ml.

40 Un método de medición específica comprende hacer reaccionar la lisina glicosilada en una solución de la muestra que contiene la lisina glicosilada y la valina glicosilada con FOD mutante en una primera reacción, descomponer el peróxido de hidrógeno producido en la reacción con catalasa o similares, haciendo reaccionar el peróxido de hidrógeno, que ha sido producido por hacer reaccionar la valina glicosilada en la solución de la muestra con FOD, en una segunda reacción, con 4-aminoantipirina (4-AA) y reactivo de Trinder, y medir colorimétricamente el color producido. Se puede añadir azida sódica a la segunda solución de reacción, que es un inhibidor de la catalasa.

45 Como inhibidor de proteasa que tiene selectividad por los componentes de globulina, que se puede utilizar para ensayar con precisión proteínas glicosiladas según la presente invención, se puede utilizar cualquier inhibidor que tenga selectividad por los componentes de globulina, siempre que, como tal, el inhibidor pueda principalmente digerir proteínas distintas de los componentes de globulina, cuando la solución de la muestra se hace reaccionar con una proteasa en presencia del inhibidor de proteasa que tiene selectividad por los componentes de globulina. Como ejemplos preferentes, se pueden mencionar ácido desoxicólico, amida de ácido desoxicólico, amida de ácido cólico, sal de amonio cuaternario, tensioactivo catiónico de tipo sal de amonio cuaternario, concanavalina A, glucósido de octilo y betaína.

50 Como amida de ácido desoxicólico, es preferente, por ejemplo, N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)-desoxicolamido. Como amida de ácido cólico, son preferentes, por ejemplo, ácido 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxiopropano sulfónico, ácido 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio] propano sulfónico, N,N-bis(3-D-gluconamido propil) colamido o similares.

60 Como sal de amonio cuaternario, son preferentes, por ejemplo, cloruro de benciltrietilamonio y cloruro de benciltri-n-butilamonio. Como tensioactivo catiónico de tipo sal de amonio cuaternario, son preferentes, por ejemplo, cloruro de lauriltrimetilamonio y óxido de laurildimetilamina.

Estos inhibidores que tienen selectividad por componentes de globulinas pueden utilizarse de forma individual o en combinación de dos o más.

65

Se puede utilizar una cantidad de estos inhibidores, que tienen selectividad por componentes de globulina, capaz de suprimir suficientemente la reacción con los componentes de globulina durante la reacción con la proteasa. Cuando se utiliza ácido desoxicólico, amida de ácido desoxicólico, amida de ácido cólico, octil glucósido, sal de amonio cuaternario o tensioactivo catiónico de tipo sal de amonio cuaternario, es preferente una concentración de aproximadamente 0,01-20%, siendo el intervalo de concentración más preferente de 0,05- 10%. La concentración también puede estar fuera de estos intervalos.

Cuando se utiliza concanavalina A, octil glucósido o betaína, por ejemplo, es aplicable una concentración aproximadamente de 0,01-10 mg/ml ó 0,005-5%, con un intervalo de concentración preferente de 0,02-2 mg/ml ó 0,05-10%, respectivamente. También se puede utilizar una concentración fuera de estos intervalos.

Como ASOx utilizada para ensayar con precisión proteínas glicosiladas, utilizando la presente invención, se puede utilizar cualquier enzima que reaccione de forma eficaz con el ácido ascórbico contenido en la solución de la muestra. Se pueden mencionar como ejemplos ASOx que se obtienen de plantas o microorganismos y similares. Se dan los siguientes ejemplos específicos, pero éstos no deben interpretarse como limitantes de las enzimas utilizables en la presente invención.

Como ejemplos de ASOx de origen vegetal, se pueden mencionar la ASOx obtenida de pepino (fabricada por Amano Enzyme Inc. o Toyobo Co., Ltd.) y la ASOx obtenida de calabaza (fabricada por Roche Co. o Toyobo Co., Ltd.).

Como ejemplos de ASOx obtenida a partir de microorganismos, se pueden mencionar la ASOx obtenida de *Acremonium* (fabricada por Asahi Kasei Corporation) y la ASOx obtenida de un microorganismo (fabricada por Amano Enzyme Inc.).

La actividad de ASOx se midió mediante el método siguiente.

< Método de medición de actividad de ASOx >

< Solución sustrato de almacenamiento >

Se disolvieron 176 mg de ácido L-ascórbico (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y 37 mg de EDTA (fabricado por Daichi Pure Chemicals Co., Ltd.) en 100 ml de ácido clorhídrico 1 mM.

< Reactivo de reacción de mezclado >

La solución sustrato de almacenamiento anterior se diluyó 20 veces con un tampón de fosfato dipotásico 5 mM - fosfato monosódico 90 mM, que contenía EDTA 0,45 mM.

< Procedimiento >

Se colocó 1 ml del reactivo de reacción de mezclado anterior en un pequeño tubo de ensayo y se precalentó a 30°C durante cinco minutos, a continuación, se añadieron 0,10 ml de una solución de enzima diluida de forma adecuada. La mezcla se agitó para iniciar la reacción. Después de la reacción durante exactamente 5 minutos, se añadieron 3,0 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico 0,2 N para terminar la reacción. Se midió la absorbancia (As) a una longitud de onda de 245 nm. Para el ensayo en blanco, se colocó 1 ml de la solución de reacción anterior en un pequeño tubo de ensayo y se precalentó a 30°C durante cinco minutos, a continuación, se añadieron 3,0 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico 0,2 N para terminar la reacción. Se añadieron 0,10 ml de una solución de enzima diluida de forma adecuada y la mezcla se agitó para medir la absorbancia (Ab) a una longitud de onda de 245 nm. La actividad enzimática se determinó a partir de la diferencia (Ab-As) entre la absorbancia (As) después de la reacción enzimática y la absorbancia del ensayo en blanco (Ab). La cantidad de enzima que oxida 1 µmol de ácido ascórbico en ácido dehidroascórbico en un minuto a 30°C se define como 1 U. La fórmula de cálculo se muestra a continuación.

$$\text{Actividad (U/ ml)} = [(As - Ab) / 10,0] \times [1/5] \times [4,10/0,10] \times [1/B]$$

10,0: coeficiente de absorbancia molecular (mM) de ácido ascórbico a 245 nm en condiciones de pH 1,0.

5: tiempo de reacción (min)

4,10: solución de reacción total (ml)

0,10: cantidad de solución de muestra de enzima utilizada para la reacción

B: aumento de dilución de la solución de enzima

La ASOx puede ser utilizada en cualquier concentración en la que pueda eliminarse una cantidad suficiente de ácido ascórbico durante la utilización de un reactivo cuando están presentes una proteasa y ASOx juntas, normalmente en el intervalo de 0,1-100 U/ml, y preferentemente de 1-50 U/ml, por ejemplo.

Como agente tampón que no tiene ningún grupo 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinilo, que se puede utilizar en combinación con ASOx para ensayar con precisión proteínas glicosiladas, según la presente invención, se puede utilizar cualquier agente tampón que pueda mantener ASOx de una manera estable, cuando la ASOx está presente junto con la proteasa. Se puede utilizar cualquier agente tampón, excepto los que tienen un grupo 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinilo, tales como ácido 3-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil] propano sulfónico (EPPS), ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil] etano sulfónico (HEPES) y ácido 2-hidroxi-3-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil] propano sulfónico (HEPPSO).

Entre los ejemplos de otros agentes tampón preferentes se incluyen: ácido N-(2-acetamida)-2-aminoetanosulfónico (ACES), ácido N-(2-acetamida) iminodiacético (ADA), ácido N,N-bis (2-hidroxi-etil)-2-aminoetanosulfónico (BES), N,N-bis-(2-hidroxi-etil) glicina (Bicine), bis(2-hidroxi-etil)iminotris(hidroxi-metil)metano (Bis-Tris), ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico (CAPS), ácido N-ciclohexil-2-hidroxi-3-aminopropanosulfónico (CAPSO), ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico (CHES), ácido 3-[N,N-bis(2-hidroxi-etil)amino]-2-hidroxi-propanosulfónico (DIPSO), ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES), ácido 3-morfolinopropanosulfónico (MOPS), ácido 2-hidroxi-3-morfolinopropanosulfónico (MOPSO), piperazina-1,4-bis(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), piperazina-1,4-bis(ácido 2-hidroxi-3-propanosulfónico) (POPSO), ácido N-tris(hidroxi-metil)metil-3-aminopropanosulfónico (TAPS), ácido 2-hidroxi-N-tris(hidroxi-metil)metil-3-aminopropanosulfónico (TAPSO), ácido N-tris(hidroxi-metil)metil-2-aminopropanosulfónico (TES), N-[tris(hidroxi-metil)metil]glicina (Tricina) y trishidroxi-metilaminometano (Tris).

Como ejemplos de agentes tampón más preferentes, se pueden mencionar trishidroxi-metilaminometano (Tris) y piperazina-1,4-bis (ácido 2-hidroxi-3-propanosulfónico) (POPSO).

Estos agentes tampón, utilizados en combinación con ASOx, se pueden utilizar en cualquier concentración a la que la ASOx sea estable en presencia de la proteasa y las reacciones de la proteasa y ASOx no se ven afectadas, habitualmente en el intervalo de 1 mM a 1 M, y preferentemente de 5 mM a 500 mM, por ejemplo.

Como agente de desnaturalización de la proteína albúmina y/o compuesto que tiene un enlace S-S, utilizado para ensayar con precisión proteínas glicosiladas en la presente invención, se puede utilizar cualquier compuesto cuya reactividad de BCP hacia GA y NGA sea equivalente.

Como ejemplos de agentes desnaturalizantes de proteínas, se pueden mencionar urea, compuestos de guanidina y tensioactivos aniónicos tales como laurilsulfato sódico (SDS), sulfato de polioxietileno alquilfenil éter, sulfato de polioxietileno alquil éter y el sulfonato de alquil benceno. Estos agentes de desnaturalización de proteínas se pueden utilizar de forma individual o en combinación de dos o más. Estos agentes de desnaturalización de proteínas se pueden utilizar en cualquier concentración a la que BCP reacciona igualmente con GA y NGA, por lo general en el intervalo de 0,01-10% y preferentemente de 0,05-5%, por ejemplo.

Como ejemplos de compuestos preferentes que tienen un enlace S-S, se pueden mencionar ácido 6,6'-ditiiodinitrotánico, ácido 3,3'-ditiiodipropiónico, ácido 2,2'-ditiiodibenzoico, ácido 4,4'-ditiiodimorfolino, disulfuro de 2,2'-dihidroxi-6,6'-dinaftilo (DDD), 2,2'-ditiopiridina (2-PDS), 4,4'-ditiopiridina (4-PDS), 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) y 2,2'-ditiobis-(5-nitropiridina).

Estos compuestos que tienen un enlace S-S se pueden utilizar en cualquier concentración en la que BCP reacciona igualmente con GA y NGA, habitualmente en el intervalo de 1  $\mu$ M a 10 mM, y preferentemente de 10  $\mu$ M a 5 mM, por ejemplo. Una concentración fuera de este intervalo no está excluida de ninguna manera.

Como estabilizador de la proteasa, utilizado para ensayar con precisión proteínas glicosiladas según la presente invención, se puede utilizar cualquier compuesto que pueda suprimir una disminución en la actividad de la proteasa durante el almacenamiento del reactivo. Un compuesto que puede suprimir una disminución en la actividad de la proteasa durante el almacenamiento del reactivo en estado líquido es particularmente preferente.

Como ejemplos preferentes del estabilizador, se pueden mencionar dimetilsulfóxido, alcohol, sal de calcio soluble en agua, cloruro de sodio, sal de amonio cuaternario y tensioactivo catiónico de tipo sal de amonio cuaternario. Como ejemplos de alcohol, se pueden mencionar etanol, propanol, etilenglicol y glicerol. Como ejemplos de la sal de amonio cuaternario y tensioactivo catiónico de tipo sal de amonio cuaternario, se pueden mencionar lauril sulfato de trietanolamina, cloruro lauriltrimetilamonio y similares.

Estos estabilizadores de la proteasa se pueden utilizar en cualquier concentración, siempre que pueda ser suprimida una disminución en la actividad de la proteasa durante el almacenamiento del reactivo, particularmente a una concentración en la que pueda ser suprimida una disminución en la actividad de la proteasa del reactivo en estado líquido durante el almacenamiento. Habitualmente, se emplea una concentración de 0,01-30% y preferentemente de 0,1 a 20%. No están excluidas concentraciones fuera de estos intervalos.

Como estabilizador de la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado, utilizado para ensayar con precisión proteínas glicosiladas según la presente invención, se puede utilizar cualquier compuesto que pueda evitar la disminución en la actividad de la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado

durante almacenamiento del reactivo. Un compuesto que puede suprimir una disminución en la actividad de la enzima durante el almacenamiento del reactivo en estado líquido es particularmente preferente.

5 Como ejemplos preferentes de estabilizadores, se pueden mencionar alcohol de azúcar, sacarosa, sal de magnesio soluble en agua, sal de calcio soluble en agua, sulfato de amonio, aminoácidos y sarcosina. Como ejemplos de alcohol de azúcar, se pueden mencionar sorbitol, manitol, trehalosa y glicerol. Aunque cualquier aminoácido muestra un fuerte efecto estabilizador, son aminoácidos preferentes prolina, ácido glutámico, alanina, valina, glicina, lisina, y similares.

10 Estos estabilizadores para la enzima que reaccionan, como mínimo, con un aminoácido glicosilado, se pueden utilizar en cualquier concentración, siempre que se pueda evitar una disminución en la actividad de la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado durante el almacenamiento del reactivo. Una concentración a la que pueda ser suprimida una disminución en la actividad de la enzima durante el almacenamiento del reactivo en estado líquido es particularmente preferente. Habitualmente, se emplea una concentración de 0,01-30% y preferentemente de 0,1 a 20%, cuando el estabilizador es un alcohol de azúcar, sacarosa, aminoácidos o sarcosina. Cuando el estabilizador es una sal de magnesio soluble en agua, sal de calcio soluble en agua o sulfato de amonio, se emplea una concentración de 1 mM a 1 M, preferentemente de 10 mM a 500 mM. No están excluidas concentraciones fuera de estos intervalos.

20 En la preparación de la composición para ensayar proteínas glicosiladas, se combinan de forma adecuada un reactivo proteolítico, que comprende una proteasa, y un reactivo de ensayo de aminoácido glicosilado, para ensayar aminoácidos o péptidos glicosilados producidos, de manera que estos reactivos puedan utilizarse en el mismo recipiente de reacción. Estos reactivos pueden ser suministrados como un producto líquido, producto congelado o producto liofilizado de los mismos.

25 En la preparación del reactivo proteolítico utilizado en la presente invención, se determinaron el pH, el agente tampón y la concentración de proteasas, de manera que las reacciones proteolíticas se lleven a cabo de forma eficiente. A continuación, se prepararon de forma adecuada el inhibidor de proteasas, que tiene selectividad por los componentes de globulina, ASOx y estabilizador de proteasa y se añadieron para tener las concentraciones eficaces mencionadas anteriormente.

30 Cuando se utiliza la proteasa de tipo XXIV (fabricada por Sigma-Aldrich), por ejemplo, se puede seleccionar una reacción a pH 7-10, ya que esta proteasa muestra fuerte actividad proteolítica aproximadamente a pH 7-10. Como solución tampón, se puede utilizar una solución de un agente tampón que no tenga un grupo 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinilo, por ejemplo, la solución tampón POPSO, que tiene una acción de tampón en el intervalo de pH de 7,2-8,5, y una concentración de POPSO puede ser de 1-100 mM y preferentemente de 10-500 mM.

35 La proteasa se puede utilizar a una concentración a la que puede descomponer proteínas glicosiladas suficientemente en una muestra durante el tiempo de reacción utilizado en la práctica, preferentemente en el intervalo de 100-500,000 PU/ml y más preferentemente de 500-100.000 PU/ml.

40 Como combinación del inhibidor de proteasa que tiene selectividad por componentes de globulina, ASOx y estabilizador de proteasa, se puede utilizar una combinación de 0,01-20%, y preferentemente de 0,05-10% de ácido sulfúrico-3-[(cólicoamidapropil)dimetilamonio]-1-propano como inhibidor de proteasa que tiene selectividad por componentes de globulina, de 0,1-100 U/ml, y preferentemente se puede utilizar 1-50 U/ml de ácido ascórbico oxidasa obtenida de calabaza (fabricada por Toyobo Co., Ltd.) y de 0,01-30 %, preferentemente de 0,1-20% de sulfóxido de dimetilo como estabilizador de proteasa, por ejemplo.

45 Para formular el reactivo para el ensayo de aminoácidos glicosilados utilizados en la presente invención, se selecciona un pH adecuado teniendo en cuenta un pH óptimo para la enzima que reacciona, como mínimo, con el aminoácido glicosilado utilizado, para asegurar una reacción eficiente, se determina la cantidad de enzima que reacciona con los aminoácidos glicosilados y, a continuación, se añade un estabilizador para la enzima que reacciona, como mínimo, con los aminoácidos glicosilados.

50 Cuando se utiliza R-DU o R-DU-II (fabricadas por Asahi Kasei Corporation), por ejemplo, se puede seleccionar una reacción a pH 6,5-10, ya que estas proteasas pueden mostrar un 50% o más de su actividad máxima actividad en el amplio intervalo de pH de 6,5-10. La enzima se puede utilizar a una concentración que puede detectar suficientemente los aminoácidos glicosilados en la solución de reacción utilizada, preferentemente en el intervalo de 0,5-200 U/ml y más preferentemente de 1-50 U/ml.

55 Se puede utilizar, por ejemplo, ácido glutámico, como estabilizador para la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado, a una concentración de 0,01-30%, y preferentemente de 0,1-20%.

60 En la formulación de la composición que contiene una enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado como primer reactivo y una proteasa como segundo reactivo, se pueden utilizar cualesquiera condiciones, siempre que el primer reactivo satisfaga las condiciones, tales como pH, concentración salina y

65

similares, en las que la proteasa y la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado puedan mostrar actividad y el segundo reactivo satisfaga las condiciones en la cuales se puede almacenar adecuadamente la proteasa.

5 Por ejemplo, cuando se utilizan R-FOD y proteasa tipo XXIV, dado que estas enzimas tienen el intervalo de pH particularmente reactivo de 6,5-10 y de 7-10, respectivamente, se selecciona el intervalo de pH de 7-10 para el primer reactivo y se selecciona un agente tampón con una concentración relativamente alta de 20-1.000 mM, por ejemplo. Por otro lado, debido a que esta proteasa es estable a pH 7 o menos, se selecciona el intervalo de pH de 7 o menos para el segundo reactivo y se selecciona un agente tampón con una concentración comparativamente menor que la utilizada para el primer reactivo, por ejemplo, en el intervalo de 1-50 mM. Además, se añade preferentemente un estabilizador de proteasa, por ejemplo, dimetilsulfóxido aproximadamente en 1-50%. En este caso, si el primer reactivo se utiliza en una cantidad mayor que el segundo reactivo, por ejemplo en una proporción del primer reactivo con respecto al segundo reactivo de 4:1, se puede añadir un estabilizador al segundo reactivo a una concentración superior y se pueden adoptar otras condiciones, tales como un pH que se desvía en gran medida del pH del primer reactivo, para el segundo reactivo.

En la formulación de la composición para la reacción enzimática para ensayar proteínas glicosiladas, se pueden seleccionar y añadir apropiadamente un tensioactivo, sal, agente tampón, agente regulador del pH, conservantes y similares.

20 Como tensioactivo, por ejemplo, se puede añadir un éter de polioxietilén alquilo, éster de ácido graso de polioxietilén sorbitán, alcohol polivinílico o similares en una cantidad de 0,01-10%, y preferentemente de 0,05-5%. Como sal, por ejemplo, se puede añadir cloruro de litio, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro de manganeso, cloruro de cobalto, cloruro de zinc, cloruro de calcio o similares, en una cantidad de 1 mM a 5 M y preferentemente de 10 mM a 1 M. Se pueden añadir varias soluciones tampón tales como solución tampón Tris-HCl, solución tampón glicina-NaOH, solución tampón de fosfato, solución tampón de Good o similares, en una cantidad de 10 mM a 2 M y preferentemente de 20 mM a 1 M. Se pueden añadir apropiadamente varios conservantes, tales como azida sódica, en una cantidad de 0,01-10%, y preferentemente de 0,05-1%.

30 En el ensayo de proteínas glicosiladas utilizando el método de la presente invención, se añaden de 0,001-0,5 ml de una muestra a la composición para el análisis de proteínas glicosiladas y se hacen reaccionar a una temperatura de 37°C. Cuando se utiliza una técnica de ensayo de velocidad, se determinan de forma directa o indirecta los cambios en la cantidad de coenzima, oxígeno disuelto, peróxido de hidrógeno, u otros productos de reacción, durante un período de varios minutos a varias decenas de minutos, entre dos puntos de tiempo específicos después del inicio de la reacción, por ejemplo, un minuto entre después de tres minutos y después de cuatro minutos del inicio de la reacción, o cinco minutos entre después de tres minutos y después de ocho minutos del inicio de la reacción, utilizando los métodos mencionados anteriormente. Cuando se utiliza una técnica de ensayo de punto final, se determinan de la misma manera los cambios en la cantidad de coenzima, oxígeno disuelto, peróxido de hidrógeno u otros productos de reacción durante un cierto período de tiempo después del inicio de la reacción. En este caso, la cantidad de proteínas glicosiladas en la muestra puede determinarse mediante la comparación de los cambios en la absorbancia y similares, con el valor determinado para una muestra con una concentración conocida de proteína glicosilada.

45 La reacción de la enzima utilizada en la presente invención, que puede reaccionar, como mínimo, con un aminoácido glicosilado se puede detectar, cuando se utiliza una deshidrogenasa, por ejemplo, mediante ensayo directo del cambio en la cantidad de la coenzima o mediante ensayo indirecto de una coenzima reducida, que se ha formado utilizando un portador de electrones, tales como diferentes diaforasas o metosulfato de fenazina y un reactivo colorante de tipo reductor, tal como una sal de tetrazolio representada por nitrotetrazolio, WST-1 o WST-8 (fabricados por Dojindo Laboratories). También se pueden aplicar otros métodos de ensayo directos o indirectos conocidos.

50 Cuando se utiliza una oxidasa, por ejemplo, es preferente medir el consumo de oxígeno o la cantidad de productos de reacción. Cuando se utiliza R-FOD, por ejemplo, se producen peróxido de hidrógeno y glucosona como productos de reacción. Tanto el peróxido de hidrógeno como la glucosona se pueden analizar de forma directa o indirecta mediante un método conocido.

55 La cantidad de peróxido de hidrógeno se puede determinar, por ejemplo, produciendo una materia colorante utilizando peroxidasa o similares y midiendo de la intensidad del color, la luz o fluorescencia emitida, mediante una técnica electroquímica, o produciendo aldehído a partir de alcohol utilizando una catalasa y midiendo la cantidad de aldehído producido.

60 Para producir una materia colorante a partir de peróxido de hidrógeno, se puede utilizar el reactivo de Trinder, que puede producir una materia colorante por condensación oxidativa de un acoplador, tal como 4-AA o 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) y un cromógeno tal como fenol, en presencia de peroxidasa, un reactivo de tipo Leuco, que puede ser oxidado directamente y produce un color en presencia de peroxidasa, o similares.

65

Como cromógeno para un reactivo de Trinder, se pueden utilizar derivados de fenol, derivados de anilina, derivados de toluidina y similares. Específicamente, se pueden mencionar N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-toluidina (TOOS), N,N-bis(4-sulfopropil)-3-metilnilina disódica (TODB) (ambos fabricados por Dojindo Laboratories), y similares.

5 Como ejemplos específicos del reactivo de tipor Leuko, se pueden mencionar N-(carboximetilaminocarbonil)-4,4-bis(dimetilamino)-bifenilamina (DA64), 10-(carboximetilaminocarbonil)-3,7-bis(dimetilamino)fenotiazina (DA67) (ambos fabricados por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y similares.

10 Se puede utilizar un compuesto que emite fluorescencia por oxidación, tal como ácido homovanílico y ácido 4-hidroxifenilacético para el método de fluorescencia. Para el método de quimioluminiscencia, se pueden utilizar luminol, lucigenina, iso-luminol y similares como catalizadores.

15 Cuando el peróxido de hidrógeno se mide utilizando electrodos, no existen limitaciones específicas para el electrodo utilizado, siempre que el electrodo esté fabricado de un material que permite el intercambio de electrones con el peróxido de hidrógeno. Se pueden mencionar platino, oro y plata como ejemplos. Se pueden utilizar métodos de electrodos convencionales, tales como amperometría, potenciometría y coulometría. Es posible proporcionar un portador de electrones entre los electrodos y la oxidasa o sustrato para medir la oxidación resultante o reducción de la corriente o la cantidad de electricidad. Se puede utilizar cualquier material que pueda mostrar una función de transferencia de electrones como el portador de electrones. Se pueden mencionar como ejemplos derivados de ferroceno y derivados de quinona. También es posible proporcionar un portador de electrones entre los electrodos y el peróxido de hidrógeno producido por la reacción de la oxidasa, para medir la oxidación resultante o reducción de la corriente o la cantidad de electricidad.

20 Cuando la proteína glicosilada es albúmina glicosilada y la cantidad de la albúmina glicosilada debe ser determinada con precisión, se puede utilizar en la presente invención cualquier reactivo de ensayo de albúmina que contiene un agente desnaturante de proteínas y/o un compuesto que tiene un enlace S-S y púrpura de bromocresol, siempre que dicho reactivo no produzca una desviación entre GA y NGA.

25 Por ejemplo, cuando se utilizan lauril sulfato de sodio y 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) como agentes desnaturantes de proteínas y/o compuesto que tiene un enlace S-S, se utiliza una solución tampón con una concentración baja, por ejemplo, de 1-20 mM, que no afecta la coloración de BPC, en el que el lauril sulfato sódico se utiliza a una concentración de 0,01-10% y preferentemente de 0,05-5%, y el 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) a una concentración de 1  $\mu$ M a 10 mM y preferentemente de 10  $\mu$ M a 5 mM. BCP se utiliza a un pH de 4,5-7,5, ya que BCP está coloreado manifiestamente a un pH superior al neutro.

30 En el ensayo de albúmina utilizando el método de la presente invención, se añaden 0,001-0,5 ml de una muestra a la composición para ensayar albúmina y se hace reaccionar a una temperatura de 37°C. La cantidad de la materia coloreada en un período de tiempo determinado después del inicio de la reacción puede determinarse por medio de un ensayo de un punto. Se mide la absorbancia cercana a 550-630 nm, ya que la albúmina-BCP presenta una absorción máxima aproximadamente a 600 nm. En este caso, la cantidad de albúmina en la muestra puede determinarse mediante la comparación con la absorbancia determinada para una muestra con una concentración conocida de albúmina y la absorbancia del blanco (agua).

35 Se puede utilizar cualquier muestra que contenga, como mínimo, una proteína glicosilada como objeto de medición de la presente invención. Entre las muestras preferentes se incluyen componentes sanguíneos tales como suero sanguíneo, plasma sanguíneo, células sanguíneas y sangre entera. Además, los eritrocitos separados se pueden utilizar como muestra preferente, porque dependiendo de las condiciones de separación, una muestra de eritrocitos separados puede contener componentes de globulina que afectan los resultados de ensayo.

40 La proteína glicosilada a ser analizada utilizando el método de ensayo de proteínas glicosiladas de la presente invención incluye GA y GHB, pero no se limita a éstas, y se puede medir cualquier proteína glicosilada.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 La figura 1 es un gráfico que muestra las curvas de medición y reproducibilidad de una solución de sustrato de HSA (4 g/dl), solución de sustrato de  $\gamma$ -globulina, y solución de sustrato de globulina IV en el Ejemplo de Referencia 4.

50 La figura 2 es un gráfico que muestra las curvas de medición y reproducibilidad de una solución de sustrato de Hb (4 g/dl), solución de sustrato de  $\gamma$ -globulina, y solución de sustrato de globulina IV en el Ejemplo 5, según la presente invención.

55 La figura 3 es un gráfico que muestra una curva de medición de albúmina glicosilada obtenida mediante el experimento en el ejemplo de referencia 6.

60 La figura 4 es un gráfico que muestra el efecto de los tipos de agentes tampón en la estabilización de la oxidasa de ácido ascórbico en la composición para ensayar proteínas glicosiladas en el ejemplo de referencia 9.

La figura 5 es un gráfico que muestra el efecto de los tipos de estabilizadores en la estabilización de proteasas en el ejemplo de referencia 11.

5 La figura 6 es un gráfico que muestra el efecto de los tipos de estabilizadores en la estabilización de la enzima capaz de reaccionar, como mínimo, con un aminoácido glicosilado en el ejemplo de referencia 12.

La figura 7 muestra una estructura común a los plásmidos pcmFOD1 a pcmFOD5 del Ejemplo 20.

10 La figura 8 es un gráfico que muestra el resultado de la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 555 nm de la solución de reacción de medición de la concentración de valina glicosilada, en la que la lisina glicosilada se ha eliminado utilizando la fructosil-aminoácido-oxidasa mutante en el Ejemplo 21 y la solución de reacción sin tratamiento de eliminación.

15 La figura 9 es un gráfico que muestra la correlación entre el método enzimático y el método de HPLC en el resultado de la medición de albúmina glicosilada en el ejemplo de referencia 22.

La figura 10 es un gráfico que muestra una curva de reacción del reactivo de ensayo de proteínas glicosiladas en el Ejemplo 23 de la presente invención.

20 MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

La presente invención se explicará mediante ejemplos en la siguiente descripción, que no pretende limitar la presente invención.

25 Ejemplo 1

Con el objetivo de cribar proteasas que no reaccionan con componentes de globulina, aminoácidos glicosilados o péptidos glicosilados producidos por la reacción de las proteasas con albúmina, se ensayaron los componentes de globulina y la hemoglobina utilizando R-FOD (fabricada por Asahi Kasei Corporation).

<Soluciones de sustrato>

35 1. Solución de sustrato de HSA; Albúmina Humana; Esencialmente Libre de Globulinas; 25 mg/ml, GA (%) = 31,9%, valor de fructosamina (FRA) = 256  $\mu\text{mol/l}$  (fabricada por Sigma-Aldrich Co.); la concentración de albúmina en la solución de sustrato se ensayó utilizando un kit de ensayo de albúmina (Albúmina II-HA Test Wako; fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). El % de GA se ensayó utilizando un analizador de albúmina glicosilada (GAA-2000, fabricado por ARKRAY, Inc.).

40 2. Soluciones de sustrato G-II y III, valor de FRA = 48  $\mu\text{mol/l}$  [Globulinas Humanas de la Fracción II y III de Cohn; 16,9 mg/ml (fabricada por Sigma-Aldrich)].

45 3. Solución de sustrato G-IV, valor de FRA = 26  $\mu\text{mol/l}$  [Globulinas Humanas de la Fracción IV de Cohn; 6 mg/ml (fabricada por Sigma-Aldrich)].

4. Solución de sustrato G-I, valor de FRA = 77  $\mu\text{mol/l}$  [Glovenin I: preparación de inmunoglobulinas (fabricada por Takeda Chemical Industries, Ltd.)].

50 5. Solución de sustrato de Hb: Hemoglobina Humana; 55 mg/ml, proporción de hemoglobina glicosilada: HbA1c = 4,5% [fabricada por Sigma-Aldrich, el valor de HbA1c se determinó utilizando un analizador de hemoglobina glicosilada (Hi-Auto Alc HA-8150, fabricado por ARKRAY, Inc.)].

El valor de fructosamina de la solución de sustrato se midió utilizando un kit analizador de fructosamina (Autowako Fructosamine, fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

55 <Preparación de la solución de reacción de proteasas>

Se mezclaron vigorosamente 200  $\mu\text{l}$  de una solución de sustrato diferente de Hb, 40  $\mu\text{l}$  de solución de proteasa a 100 mg/ml (una solución con una concentración tan cercana a 100 mg/ml como sea posible, si no se puede preparar una solución de 100 mg/ml, o como tal si la solución de la proteasa es líquida), y 10  $\mu\text{l}$  de solución tampón Tris 1 M (pH 8) y se dejó reaccionar a 37°C durante 30 minutos. La solución de reacción se filtró a través de una membrana NMWL 10.000 (Ultrafree MC, fabricada por Millipore Corp.). El filtrado se utilizó como la muestra de reacción de la proteasa. El mismo procedimiento se llevó a cabo utilizando agua destilada en lugar del sustrato para preparar una muestra en blanco.

65

Para la solución de sustrato de Hb, se mezclaron vigorosamente 150 µl de la solución de sustrato, 60 µl de solución de proteasa a 200 mg/ml (una solución con una concentración tan cercana a 200 mg/ml como sea posible, si no se puede preparar una solución de 200 mg/ml, o como tal si la solución de la proteasa es líquida) y 5 µl de solución tampón Tris 1 M (pH 8) y se dejó reaccionar a 37°C durante 60 minutos. La solución de reacción se filtró a través de una membrana NMWL 10.000 (Ultrafree MC, fabricada por Millipore Corp.). El filtrado se utilizó como la muestra de reacción de la proteasa. El mismo procedimiento se llevó a cabo utilizando agua destilada en lugar del sustrato para preparar una muestra en blanco.

<Ensayo de aminoácidos glicosilados y péptidos glicosilados en la muestra de reacción de la proteasa >

<Composición de la solución de reacción>

50 mM Tampón Tris (pH 8,0)  
 0,02% 4-AA (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)  
 0,02% N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-toluidina (TOOS) (fabricada por Dojindo Laboratories).  
 2 U/ml R-FOD (fabricado por Asahi Kasei Corporation)  
 5 U/ml POD (fabricado por Sigma-Aldrich)

<Procedimiento de reacción>

Se añadieron 300 µl de la solución de reacción anterior para ensayar aminoácidos glicosilados a una celda y se incubó durante tres minutos a 37°C. Se midió la absorbancia a 555 nm (A<sub>0</sub>). A continuación, se añadieron 30 µl de la muestra de reacción de la proteasa a la celda y se incubó durante cinco minutos a 37°C. Se midió la absorbancia a 555 nm (A<sub>1</sub>). Se llevó a cabo el mismo procedimiento utilizando la muestra en blanco en lugar de la muestra de reacción de la proteasa. Se midieron las absorbancias (A<sub>0</sub> blanco y A<sub>1</sub> blanco). La reacción de la proteasa con las proteínas glicosiladas se indica mediante el cambio de absorbancia siguiente.

$$\Delta A = (A_1 - A_0) - (A_1 \text{ blanco} - A_0 \text{ blanco})$$

La reactividad (ΔA) de proteasas típicas con albúmina, globulina y hemoglobina a pH 8,0 se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Actividad de diferentes proteasas sobre varias proteínas (unidad: mAbs)

Nombre de la proteasa	Origen	ΔA		
		HSA	GI	Hb
Carboxipeptidasa A	Pancreas de vaca	<1	50	13
Aminopeptidasa M		<1	21	<1
Proteasa tipo I		52	25	9
Tripsina		11	15	<1
Quimotripsina		25	103	7
Pancreatina		52	100	17
Carboxipeptidasa W	Trigo	7	18	1
Papaína	Papaya	15	5	<1
Proteasa tipo VIII	<i>Bacillus</i>	90	84	33
Proteasa tipo IX		33	12	<1
Proteasa tipo XXIV		172	91	2
Proteasa tipo XXVII		93	88	27
Alcalasa		92	49	17
Orientasa-22BF		168	51	24
Orientasa-90N		136	44	5
Bioprasa SP-4FG		63	37	9
GODO-BAP		37	31	14
Toyozima NEP-160		130	47	23
Proteasa alcalofílica		133	50	19
Proteasa cristalina NAK		180	18	30
Proteasa tipo XIX	<i>Aspergillus</i>	20	22	33
Proteasa tipo XXIII		49	27	11
Flavourozima		59	17	25
Protin FN		37	20	<1
Proteasa A		44	16	19
Sumiteam MP		76	35	27
Sumizima FP		37	7	11
Newlasa F	<i>Rhizopus</i>	<1	18	9
Enzima PD	<i>Penicillium</i>	<1	19	1
Pronasa	<i>Streptomyces</i>	109	152	42
Proteasa tipo XIV		112	125	41

Nombre de la proteasa	Origen	ΔA		
		HSA	GI	Hb
Proteasa tipo XXI		75	35	11
Proteasa tipo XVII	<i>Staphylococcus</i>	<1	20	<1
Carboxipeptidasa Y	Levadura	2	14	4
Proteinasa K	<i>Tritirachium</i>	79	45	32
Aminopectidasa T	<i>Thermus</i>	<1	18	<1
Acromopeptidasa	<i>Achromobacter</i>	24	3	16
Regelendproteinasa		13	26	7

Entre los componentes de globulina, sólo se describen los resultados para la solución de sustrato G-I en la tabla 1, debido a que todas las proteasas no reaccionaron o sólo hubo una pequeña reacción con las proteínas glicosiladas en la solución de sustrato G-IV y los valores determinados para la soluciones de sustrato G-II y G-III fueron casi los mismos que los determinados para la solución de sustrato G-I. Como puede verse claramente en la tabla 1, las proteasas obtenidas de *Aspergillus* y la proteasa tipo XIV mostraron una buena reactividad con la globulina glicosilada en los componentes de globulina.

Sin embargo, las endoproteasas y exoproteasas que reaccionan con GA en albúmina y GHB en hemoglobina mostraron una reacción con la globulina glicosilada en los componentes de globulina. Estos resultados sugieren que cuando se ensaya GA en suero sanguíneo o plasma sanguíneo, o GHB en sangre entera o corpúsculos, el efecto de los componentes globulina no puede evitarse solamente mediante la selección del tipo de proteasa.

#### Ejemplo de Referencia 2

<Cribado de inhibidor de proteasa selectivo de componente de globulina >

Con la utilización de la proteasa de tipo XXIV (fabricada por Sigma-Aldrich Co.), que tiene una alta reactividad con la solución de sustrato de HSA, se cribaron componentes que disminuyen la reacción de la proteasa con las soluciones de de sustrato de globulina anteriores, en base a la solución de sustrato de HSA.

<Composición de la solución de reacción>

#### Reactivo proteolítico R-1

150 mM Solución tampón tricina (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), pH 8,5  
 2.500 U/ml Proteasa de tipo XXIV (fabricada por Sigma-Aldrich Co.) + inhibidor de proteasa selectivo de componente de globulina (ácido desoxicólico, amida de ácido desoxicólico, amida de ácido cólico, sal de amonio cuaternario, o tensioactivo catiónico de tipo sal de amonio cuaternario: 1%, concanavalina A: 0,21 mg/mL, betaína: 0,1%, octil-glucósido: 1%, fabricado por los Dojindo Laboratories)

#### Reactivo de ensayo de aminoácido glicosilado R-2

150 mM Solución tampón tricina (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), pH 8,5  
 0,12% 4-AA (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)  
 0,08% TOOS (fabricado por Dojindo Laboratories)  
 24 U/mL R-FOD (fabricada por Asahi Kasei Corporation)  
 20 U/mL POD (fabricado por Sigma-Aldrich)

En el reactivo proteolítico R-1, como amida de ácido desoxicólico, se utilizó bisgluconamidopropildesoxicolamida, como amida de ácido cólico, se utilizó ácido sulfúrico-3-[(colamidopropil) dimetilamonio]-1-propano, ácido sulfúrico-3-[(colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propano, o bisgluconamidopropilcolamida, como sal de amonio cuaternario, se utilizó cloruro de benciltrietilamonio o cloruro de benciltri-n-butilamonio, y como tensioactivo catiónico de tipo sal de amonio cuaternario, se utilizó cloruro de lauriltrimetilamonio u óxido de laurildimetilamina.

<Soluciones de sustrato>

1. Solución de sustrato de HSA: Albúmina Humana: 40 mg/mL, GA (%) = 10,5% [fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., la concentración de albúmina en la solución de sustrato se ensayó utilizando un kit de ensayo de albúmina (albúmina II-HA Test Wako; fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). El % de GA se ensayó mediante un analizador de albúmina glicosilada (GAA-2000, fabricado por ARKRAY, Inc.).

2. Se añadió solución de sustrato de adición de  $\gamma$ -globulina, 17,0 mg/mL de  $\gamma$ -globulina [ $\gamma$ -Globulinas Humanas (fabricadas por Sigma-Aldrich), Valor de fructosamina = 34  $\mu$ M], a la solución de sustrato de HSA anterior.

## &lt;Procedimiento de reacción&gt;

8  $\mu\text{L}$  de cada una de las soluciones de sustrato (solución de sustrato de HSA, solución de sustrato G-I), se añadieron a 240  $\mu\text{L}$  de R-1 y se incubó a 37°C. La reacción se inició a 37°C y exactamente cinco minutos después, se añadieron a la misma 80  $\mu\text{L}$  de R-2. Se midieron las absorbancias a una longitud de onda de 546 nm antes y después de la adición de R-2. La diferencia de las dos mediciones fue considerada como el cambio de absorbancia. Se llevó a cabo el mismo procedimiento utilizando agua destilada en lugar del sustrato para preparar una muestra de blanco. Además, se utilizó una solución de reacción sin la adición de inhibidor de proteasa selectivo de globulina como control.

Se calculó  $\Delta A$  (HSA) restando el cambio de absorbancia de la muestra blanco del cambio de absorbancia obtenido para la solución de sustrato de HSA. Se calculó  $\Delta A$  (+  $\gamma$ -globulina) restando el cambio de absorbancia de la muestra blanco del cambio de absorbancia obtenido para la solución de sustrato a la que se añadió la  $\gamma$ -globulina.

Efecto de la adición de  $\gamma$ -globulina =  $(\Delta A (+ \gamma\text{-globulina}) - \Delta A (\text{HSA})) / \Delta A (\text{HSA}) \times 100 (\%)$

Se compararon los valores obtenidos en presencia y ausencia (control) de los diferentes compuestos candidatos. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Cribado de inhibidores de proteasa selectivos de globulina

Nombre de los aditivos	Concentración (%)	Efecto de $\gamma$ -globulina
Control	-	23,8
Derivados de ácido cólico		
Ácido cólico	1,0	23,0
Ácido desoxicólico	1,0	20,0
N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)desoxicolamido	1,0	19,9
Ácido sulfúrico-3-[(colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano	1,0	17,9
Ácido sulfúrico-3-[(colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propano	1,0	18,0
N,N-bis(3-D-gluconamidopropil)colamido	1,0	21,0
Sal de amonio cuaternario		
Cloruro de benciltrimetilamonio	1,0	23,2
Cloruro de benciltriethylamonio	1,0	16,5
Cloruro de benciltributilamonio	1,0	15,1
Bromuro de benciltrimetilamonio	1,0	23,1
Bromuro de benciltriethylamonio	1,0	22,9
Tensioactivo catiónico de tipo sal de amonio cuaternario		
Cloruro de lauriltrimetilamonio	1,0	16,7
Cloruro de alquilbencildimetilamonio	1,0	23,2
Óxido de laurildimetilamina	1,0	17,8
Otros		
Betaína	0,10	7,6
Concanavalina A	0,21 mg/mL	14,9
Octilglucósido	1,0	18,5

Tal como se puede observar en la tabla 2, se identificó el efecto de inhibición de una reacción de la proteasa con globulina en ácido desoxicólico, amida de ácido desoxicólico, amida de ácido cólico, sal de amonio cuaternario o tensioactivo catiónico de tipo sal de amonio cuaternario, concanavalina A, octilglucósido, y betaína, confirmando que principalmente se pueden digerir otras proteínas diferentes a globulina si se utilizan estos inhibidores de proteasa selectivos de componentes de globulina y proteasas.

Se realizó la misma medición utilizando la solución de sustrato de Hb en lugar de la solución de sustrato de HSA, con la condición de que cuando se utiliza la solución de sustrato Hb, las proteínas fueron eliminadas utilizando ácido tricloroacético después de la reacción con R-1, a continuación, se neutralizó el residuo y se añadió R-2. En caso que se utilice la solución de sustrato de Hb, también se confirmó que tienen el efecto de inhibir una reacción de la proteasa con globulina el ácido desoxicólico, amida de ácido desoxicólico, amida de ácido cólico, sal de amonio cuaternario o tensioactivo catiónico de tipo sal de amonio cuaternario, concanavalina A y betaína.

## Ejemplo de Referencia 3

<Efecto inhibidor de la proteasa selectiva de componente de globulina del ácido sulfúrico-3-[(colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano>

Se confirmó el efecto inhibidor de la proteasa selectiva de componente de globulina del ácido sulfúrico-3-[(colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano utilizando diferentes proteasas.

Reactivo proteolítico R-1

150 mM Solución tampón tricina (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), pH 8,5  
 2.500 U/ml Proteasa \*  
 1% ácido sulfúrico-3-[(colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano  
 \*Orientasa 22BF (fabricada por HBI, Enzymes Inc.), proteasa tipo VIII, proteasa tipo XIV, y proteasa tipo XXVII (anteriores, fabricadas por Sigma-Aldrich) se utilizaron como proteasa.

Reactivo de ensayo de aminoácidos glicosilados R-2

5

El mismo que en el Ejemplo de Referencia 2.

<Soluciones de sustrato>

10 Las mismas que en el Ejemplo de Referencia 2.

<Procedimiento de reacción>

15 Se compararon los efectos de la adición de  $\gamma$ -globulina en presencia y ausencia (control) de ácido sulfúrico-3-[(colamidopropil) dimetilamonio]-1-propano de la misma manera que en el Ejemplo de Referencia 2. Los resultados se muestran en la tabla 3. En la columna del criterio, se indicaron con un círculo los casos en que se disminuyó significativamente el efecto de la adición de  $\gamma$ -globulina.

Tabla 3. Efecto inhibitor de la proteasa selectiva de componente de globulina del ácido sulfúrico-3-[(colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano

20

Nombre de la proteasa	Concentración (%)	Efecto del $\gamma$ -globulina (%)	Criterio
Orientasa-22BF	0,0	20,8	-
	1,0	11,8	○
Proteasa tipo VIII	0,0	20,3	-
	1,0	15,6	○
Proteasa tipo XIV	0,0	30,6	-
	1,0	20,6	○
Proteasa tipo XXVII	0,0	28,6	-
	1,0	19,0	○

25 Tal como se puede observar en la tabla 3, Orientasa 22BF, proteasa tipo VIII, proteasa tipo XIV y proteasa tipo XXVII disminuyeron la reacción de la proteasa con el sustrato de  $\gamma$ -globulina en presencia de ácido sulfúrico-3-[(colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propano, mientras que todas estas proteasas mantuvieron la reacción con el sustrato de HSA. Estos resultados han dejado claro que los inhibidores de proteasa selectivos de componente de globulinas de la presente invención son eficaces con independencia del tipo de proteasa.

30 Además, incluso cuando se ensaya GHb, el efecto de los componentes de globulina también se podría evitar utilizando la presente invención.

Ejemplo de Referencia 4

<Linealidad de la dilución de albúmina glicosilada>

35 Reactivo proteolítico R-1

150 mM Solución tampón tricina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), pH 8,5  
 2.500 U/ml Proteasa de tipo XXVII (fabricada por Sigma-Aldrich Co.)  
 1% ácido sulfúrico-3-[(colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propano (fabricado por Sigma-Aldrich)

Reactivo de ensayo de aminoácidos glicosilados R-2

40 El mismo que en el Ejemplo de Referencia 2.

<Soluciones de sustrato>

45 1. Solución de sustrato de HSA: la misma que en el Ejemplo 1, con la condición que se utilizó la solución a una concentración de 4,0 g/dl.  
 2. Solución de sustrato de  $\gamma$ -globulina: la misma que en el Ejemplo de Referencia 2  
 3. Solución de sustrato de Globulina IV: la misma que en el Ejemplo 1

<Procedimiento>

5 La solución de sustrato de HSA (4 g/dl), la solución de sustrato de  $\gamma$ -globulina ( $\gamma$ G) (1,7 g/dl) y la solución de sustrato de globulina IV (GIV) (1,7 g / dl) se diluyeron con amplificación de 0,0, 0,5, 1,0, 1,5, y 2,0 veces, para confirmar la linealidad de la dilución. Se siguió el mismo procedimiento que en el Ejemplo de referencia 3, con la condición que se ensayó 10 veces la muestra de HSA de dilución 1,0 vez, para calcular el valor de CV. Los resultados se muestran en la figura 1.

10 Como puede observarse en la Figura 1, la absorbancia no varió al variar la concentración de la solución de sustrato de  $\gamma$ -globulina o la solución de sustrato de globulina IV (GIV). Por otro lado, la solución de sustrato de HSA mostró una buena linealidad correspondiente a la concentración, lo que indica que se puede ensayar albúmina glicosilada sin verse afectada sustancialmente por los componentes de globulina. Se confirmó una reproducibilidad excelente de valor de CV = 0,9% con la concentración de HSA diluida 1,0 vez, lo que indica que se puede ensayar selectivamente albúmina glicosilada con buena sensibilidad y excelente reproducibilidad en un tiempo de reacción de 10 minutos.

Ejemplo 5

<Linealidad de la dilución de la hemoglobina glicosilada>

20

Reactivo proteolítico R-1

77 mM Solución tampón Tris ( pH 8,0)  
 2.500 U/ml Proteasa de tipo XIV (fabricada por Sigma-Aldrich Co.)  
 1% ácido sulfúrico-3-[(colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propano (fabricado por Sigma-Aldrich)

Reactivo R-2 de ensayo de aminoácidos glicosilados

25

El mismo que en el Ejemplo de Referencia 2.

<Soluciones de sustrato>

30 Se utilizaron la misma solución de sustrato de Hb que en el Ejemplo 1 y la misma solución de sustrato de  $\gamma$ -globulina y la solución de sustrato de globulina IV que en el ejemplo de referencia 4.

<Procedimiento>

35 Se prepararon muestras con concentraciones de 0,0, 0,5, 1,0, 1,5 y 2,0 veces la de la solución de sustrato de Hb (4 g/dl), la solución de sustrato de  $\gamma$ -globulina (1,7 g/dl) y la solución de sustrato de globulina IV (1,7 g/dl), para confirmar la linealidad de dilución. Se siguió el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, con la condición que se ensayó 10 veces la muestra de Hb de dilución 1,0 vez, para calcular el valor de CV. Los resultados se muestran en la figura 2.

40

45 Como puede observarse en la Figura 2, la absorbancia no varió al variar la concentración de la solución de sustrato de  $\gamma$ -globulina o la solución de sustrato de globulina IV (GIV). Por otro lado, la solución de sustrato de Hb mostró una buena linealidad correspondiente a la concentración, lo que indica que se puede ensayar hemoglobina glicosilada sin verse afectada sustancialmente por los componentes de globulina. Se confirmó una reproducibilidad excelente de valor de CV = 2,0% con la concentración de Hb diluida 1,0 vez, lo que indica que, si se utiliza el método de ensayo de la presente invención, se puede ensayar selectivamente hemoglobina glicosilada con buena sensibilidad y excelente reproducibilidad en un tiempo de reacción de 10 minutos.

Ejemplo de referencia 6

50

<Linealidad de la albúmina glicosilada>

Reactivo proteolítico R-1

55 El mismo que en el Ejemplo de referencia 4.

Reactivo R-2 de ensayo de aminoácidos glicosilados

El mismo que en el Ejemplo de referencia 4.

60

<Soluciones de sustrato>

Suero sanguíneo A) \*suero sanguíneo de diabético, GA (%) = 32,9%; concentración de albúmina: 4,3 g/dl

Suero sanguíneo B) \*suero sanguíneo de una persona sana GA (%) = 16,4%; concentración de albúmina: 4,1 g/dl

5 \*Los sueros sanguíneos anteriores A) y B) se mezclaron en proporciones 10:0, 8:2, 6:4, 4:6, 2:8, y 0:10, para producir muestras mezcladas.

<Procedimiento>

10 El mismo que en el Ejemplo de referencia 3.

Los resultados se muestran en la figura 3.

15 Como se puede observar en la figura 3, se obtuvo una excelente linealidad utilizando muestras con la misma concentración de albúmina y una proporción de albúmina glicosilada diferente. Por consiguiente, se confirmó que el método para ensayar proteínas glicosiladas analiza cuantitativamente albúmina glicosilada en suero sanguíneo y plasma sanguíneo en la práctica. Además, debido a que se demostró la misma linealidad utilizando una solución de sustrato de hemoglobina, preparada por hemolisis de eritrocitos en lugar de suero sanguíneo, se confirmó que el método para ensayar proteínas glicosiladas de la presente invención analiza también cuantitativamente hemoglobina glicosilada.

20 Ejemplo de Referencia 7

<Correlación entre los métodos de ensayo de albúmina glicosilada por HPLC y por el método enzimático (la presente invención)>

25 Reactivo proteolítico R-1

El mismo que en el Ejemplo de referencia 4.

30 Reactivo de ensayo de aminoácidos glicosilados R-2

El mismo que en el Ejemplo de referencia 4.

35 <Soluciones de sustrato>

Suero sanguíneo de diabéticos: 14 muestras  
Suero sanguíneo de personas sanas: 25 muestras

40 <Procedimiento>

Se siguió el mismo procedimiento que en el Ejemplo de Referencia 2.

45 Se identificó una correlación entre el método enzimático y un método de HPLC conocido, utilizando 14 muestras de suero sanguíneo de diabéticos. Se determinó la proporción de albúmina glicosilada mediante el método de HPLC utilizando un analizador de albúmina glicosilada (GAA-2000, fabricado por ARKRAY, Inc.). El cambio de absorbancia obtenido en el método enzimático muestra una correlación muy alta con la proporción de albúmina glicosilada (coeficiente de correlación  $r = 0,991$ ), confirmando que el método de análisis enzimático puede medir con precisión albúmina glicosilada.

50 Ejemplo 8

<Efecto de los tipos de agente tampón sobre la estabilización de las oxidasas de ácido ascórbico>

55 <Composición de la solución de reacción>

150 mM      Varias soluciones tampón ( pH 8,0)  
2.500 U/ml    Proteasa de tipo XXIV (fabricada por Sigma-Aldrich Co.) o Pronasa (fabricado por Sigma-Aldrich)  
10 U/ml      Oxidasa de ácido ascórbico (ASO-311, fabricada por Toyobo Co., Ltd.)

R-1 Como agente tampón en el reactivo proteolítico.

60 Se utilizaron ácido 3-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil] propanosulfónico (EPPS), ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]etanosulfónico (HEPES), ácido 2-hidroxi-3-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]propanosulfónico (HEPPSO), trishidroximetilaminometano (Tris), ácido piperazina-1,4-bis(2-hidroxi-3-propanosulfónico (POPSO) (los compuestos anteriores: fabricados por Dojindo Laboratories) y ácido fosfórico (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

## &lt;Procedimiento&gt;

Las soluciones de reacción mencionadas anteriormente se prepararon utilizando varios agentes tampón. Una parte de cada solución se utilizó como control después de medir la actividad de la oxidasa del ácido ascórbico. Se empleó el < Método para la medición de la actividad de la oxidasa del ácido ascórbico (ASOx) >, descrito anteriormente, para la medición de la actividad. La parte restante de las soluciones de reacción se almacenó durante dos días a temperatura ambiente y se midió la actividad de la misma manera. Se calculó la proporción de la actividad después de almacenamiento durante dos días a temperatura ambiente con respecto a la actividad del control, para comparar la estabilidad de las oxidasas de ácido ascórbico. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Efecto de los tipos de agente tampón sobre la estabilización de las oxidasas de ácido ascórbico

Agente tampón	Actividad relativa (%)			
	Proteasa tipo XXIV		Pronasa	
	ASO-311	ASO-312	ASO-311	ASO-312
EPPS	35	30	13	31
HEPES	31	34	17	37
HEPPSO	37	22	14	34
Tris	52	44	55	62
POPSO	62	56	80	80
Ácido fosfórico	77	86	88	108

Como se puede observar en la tabla 4, las oxidasas de ácido ascórbico eran evidentemente más estables en presencia de una proteasa en el caso en que se utilizó como agente tampón trishidroximetilaminometano (Tris), piperazina-1,4-bis(ácido 2-hidroxi-3-propanosulfónico) (POPSO) o ácido fosfórico, que no tienen un grupo 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinilo, que cuando se utilizó como agente tampón ácido 3-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]propanosulfónico (EPPS), ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-etanosulfónico (HEPES) o ácido 2-hidroxi-3-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]propanosulfónico (HEPPSO), que tienen un grupo 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinilo.

También era evidente que los mismos efectos se confirmaron con independencia de los tipos de oxidasas de ácido ascórbico y proteasas.

## Ejemplo de Referencia 9

< Efecto de los tipos de agente tampón sobre la estabilización de las oxidasas de ácido ascórbico en composiciones para ensayar proteínas glicosiladas >

## &lt;Composición de la solución de reacción&gt;

## Reactivo proteolítico R-1

150 mM      Varias soluciones tampón Tris (pH 8,0)  
 2.500 U/ml    Proteasa de tipo XXIV (fabricada por Sigma-Aldrich Co.)  
 2,0 mM      4-aminoantipirina (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)  
 10 U/ml      Oxidasa de ácido ascórbico (fabricada por Toyobo Co., Ltd.)

## Reactivo de ensayo de aminoácidos glicosilados R-2

150 mM      Solución tampón HEPES (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), pH 7,5  
 6,0 mM      TOOS (fabricado por Dojindo Laboratories)  
 24 U/ml      R-FOD (fabricada por Asahi Kasei Corporation)  
 20 U/ml      POD (fabricado por Sigma-Aldrich)

Se utilizaron EPPS, HEPES, HEPPSO, Tris y POPSO como agentes tampón en el reactivo proteolítico R-1.

## &lt;Solución de sustrato de control y solución de sustrato de adición de ácido ascórbico &gt;

Se preparó una solución de sustrato de adición de ácido ascórbico añadiendo un volumen de ácido ascórbico (1 g/dl) (fabricado por Kokusan Chemical Co., Ltd.) a nueve volúmenes de un "pool" de suero sanguíneo humano. Se utilizó una solución preparada añadiendo de agua destilada en lugar de ácido ascórbico como solución de sustrato de control.

## &lt;Procedimiento de reacción&gt;

Se añadieron 8 µl de la solución de sustrato de control o de solución de sustrato de adición de ácido ascórbico a 240

5  $\mu$ l de R-1 incubado a 37°C. La reacción se inició a 37°C, y exactamente 5 minutos después, se añadieron 80  $\mu$ l de R-2. Se midió la absorbancia a 555 nm antes de la adición de R-2 y cinco minutos después de la adición de R-2. Se calculó  $\Delta A_0$  restando el cambio de absorbancia obtenido de una muestra blanco, utilizando agua destilada en lugar de la solución de sustrato, del cambio de absorbancia obtenido de la medición de absorbancia en la solución de sustrato de control y la solución de sustrato de adición de ácido ascórbico. La misma solución de reacción R-1 se almacenó a temperatura ambiente durante 24 horas, y se midió la absorbancia de la misma manera para calcular  $\Delta A_{24}$ . Se calculó la proporción de  $\Delta A_0$  y  $\Delta A_{24}$  obtenida de la solución de sustrato de adición de ácido ascórbico, suponiendo que el cambio de absorbancia obtenido en la solución de sustrato de control es 100. Los resultados se muestran en la figura 4.

10 Debido a que el ácido ascórbico muestra efectos significativamente negativos sobre el sistema de medición, no se pueden observar señales de proteínas glicosiladas si se omite la reacción de eliminación cuando se utiliza la concentración de 100 mg/dl. Tal como se observa en la figura 4, los sistemas de ensayo de proteínas glicosiladas que utilizan Tris o POPSO, que no tienen un grupo 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinilo, no mostraron ningún cambio en la capacidad de eliminación de ácido ascórbico, después del almacenamiento durante 24 horas a temperatura ambiente. Por otro lado, los sistemas que utilizan como agente tampón EPPS, HEPES o HEPPSO, que tienen un grupo 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinilo, no mostraron casi ninguna capacidad de eliminación de ácido ascórbico después del almacenamiento durante 24 horas a temperatura ambiente. Basado en los resultados anteriores, se encontró que las oxidasas de ácido ascórbico son más estables en el sistema de ensayo que utiliza un agente tampón que no tiene el grupo 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinilo, que en el sistema que utiliza un agente tampón que tiene el grupo 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinilo, en un reactivo de ensayo de proteínas glicosiladas en el que están presentes una proteasa y oxidasas de ácido ascórbico.

#### Ejemplo 10

25 <Diferencia en la reactividad de bromocresol púrpura con respecto a albúmina glicosilada y albúmina no glicosilada y efecto de un agente desnaturizante de proteínas y/o compuesto que tiene enlace S-S>

30 <Composición de la solución de reacción>

Reactivo de pretratamiento R-1

10 mM Solución tampón Tris-HCl (pH 8,0) + agente desnaturizante de proteínas y/o compuesto que tiene enlace S-S en varias concentraciones; se añadió agua destilada como control

Reactivo de coloración de albúmina R-2

35 200 mM Solución tampón de ácido succínico (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), pH 5,5  
0,15 mM Bromocresol púrpura (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)  
0,3% Tx-100 (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

Se utilizaron los siguientes compuestos 1) - 9) como agentes desnaturizantes de proteínas y/o compuestos que tienen enlace S-S en el reactivo de pretratamiento R-1.

- 40 1) Ácido 6,6'-ditioldinicotínico: 100 mM  
2) Ácido 3,3'-ditioldipropiónico: 100 mM  
3) Ácido 2,2'-ditioldibenzoico: 100 mM  
4) 4,4'-ditioldimorfolino: 100 mM  
5) DTNB (50 mM)  
45 6) DDD (33 mM)  
7) 2-PDS (25 mM)  
8) 4-PDS (50 mM)  
9) SDS (0,3%)

- 50 1) - 5) fabricados por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.  
6) - 9) fabricados por Dojindo Laboratories

<Muestras>

55 Se utilizaron como muestras albúmina glicosilada, albúmina no glicosilada, suero sanguíneo de personas sanas y suero sanguíneo de pacientes y se utilizó agua destilada como blanco. La albúmina glicosilada y la albúmina no glicosilada se obtuvieron de suero de sangre humana, se purificó la albúmina por un método conocido y utilizando una resina inmovilizada de ácido bórico.

<Procedimiento de reacción>

Se añadieron 2 µl de una muestra a 160 µl del reactivo de pretratamiento incubado a 37°C. La reacción se inició a 37°C y, exactamente cinco minutos después, se añadieron 160 µl del reactivo de coloración de albúmina. Se midió la absorbancia a 600 nm antes de la adición del reactivo de coloración de albúmina y cinco minutos después de la adición del reactivo de coloración de albúmina. Se preparó una curva de calibración utilizando agua destilada y una muestra con una concentración conocida de albúmina en lugar de la muestra. Se ensayó por separado una muestra mediante un método inmunológico utilizando un reactivo de látex (reactivo LX, Alb-II, fabricado por Eiken Chemical Co., Ltd.) como control. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5

Reactivo	Método inmunológico	Método de BCP				
		Ninguno	1	2	3	4
Agua	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
NGA	37,5	36,1	35,6	35,7	38,0	39,5
GA	8,1	7,9	7,6	7,9	7,7	7,7
Suero sanguíneo de personas sanas	43,0	38,4	38,2	37,9	40,1	41,3
Suero sanguíneo de pacientes	40,5	36,2	36,7	37,0	35,0	31,3

Tabla 5 (continuación)

Reactivo	Método inmunológico	Método de BCP				
		5	6	7	8	9
Agua	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0
NGA	37,5	38,4	36,9	36,8	36,2	37,4
GA	8,1	8,7	7,6	7,8	7,5	7,8
Suero sanguíneo de personas sanas	43,0	38,3	39,1	38,9	38,8	43,7
Suero sanguíneo de pacientes	40,5	35,5	37,7	36,8	36,2	40,7

Tal como puede observarse en la tabla 5, el valor para NGA fue inesperadamente bajo en el método BCP sin pretratamiento. De la misma manera, la desviación del método inmunológico con respecto al método de BCP fue menor en los pacientes con una pequeña cantidad de NGA, que en personas sanas con una gran cantidad de NGA. La desviación del método inmunológico disminuyó significativamente mediante el pretratamiento con el agente desnaturizante de proteínas y/o el compuesto que tiene enlace S-S. Entre éstos, es particularmente notable el efecto del ácido 2,2'-ditiosalisílico y de 4,4'-ditiodimorfolina, DDD, 2-PDS, 4-PDS, DTNB y laurilsulfato de sodio. Como resultado, se confirmó que si una muestra se trata previamente con un agente desnaturizante de proteínas y/o un compuesto que tiene enlace S-S y BCP se hace reaccionar simultáneamente, o después del pretratamiento cuando se ensaya la proporción de albúmina glicosilada, se puede evitar un error en el negativo lado debido a NGA, asegurando la determinación precisa de la proporción de albúmina glicosilada.

Ejemplo de Referencia 11

<Estabilización de la proteasa>

<Composición de la solución de reacción>

Reactivo proteolítico R-1

150 mM Solución tampón Tris (pH 8,5)  
 5.000 PU/ml Proteasa de tipo XXIV (fabricada por Sigma-Aldrich Co.)  
 8 mM 4-aminoantipirina (fabricada por Dojindo Laboratories)  
 15 U/ml Peroxidasa  
 1,0% Ácido sulfúrico-3-[(colamidopropil)-dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propano (fabricado por Sigma-Aldrich Co.) + Estabilizador de proteasas con varias concentraciones (se añadió agua destilada como control.)

Reactivo de ensayo de aminoácidos glicosilados R-2

150 mM Solución tampón Tris (pH 8,5)  
 24 U/ml R-FOD-II (fabricada por Asahi Kasei Corporation)  
 12 mM TOOS (fabricado por Dojindo Laboratories)

Los siguientes compuestos 1) - 7) se utilizaron como estabilizadores de proteasa en el reactivo de pretratamiento.

- 1) 0,5 mM Cloruro de magnesio
- 2) 10 mM Cloruro de calcio
- 3) 100 mM Cloruro de sodio

- 4) 0,1% Etilen glicol (EtGly)
- 5) 10% Dimetilsulfóxido (DMSO)
- 6) 1% Etanol (EtOH)
- 7) 0,1% Trietanolamina lauril sulfato (TEALS)

5 1) - 7) fabricados por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

<Muestra>

10 5 g/dl de HSA (LOT38H7601, fabricado por Sigma-Aldrich)

<Procedimiento de reacción>

15 Se añadieron 8 µl de una muestra a 240 µl del reactivo proteolítico incubado a 37°C. La reacción se inició a 37°C y, exactamente 5 minutos después, se añadieron 80 µl del reactivo de ensayo de aminoácidos glicosilados. Se midió la absorbancia a 546 nm antes de la adición del reactivo de ensayo de aminoácidos glicosilados y cinco minutos después de la adición del reactivo de ensayo de aminoácidos glicosilados. Se calculó  $\Delta A_0$  restando el cambio de absorbancia obtenido de una muestra blanco, utilizando agua destilada en lugar de la solución de sustrato, del cambio de absorbancia obtenido de la medición de absorbancia en la solución de sustrato. La misma solución de

20 reacción de reactivo proteolítico se almacenó a 37°C durante 24 horas, y se midió la absorbancia de la misma manera. Se calculó  $\Delta A_{24}$  basándose en los resultados de la medición de absorbancia. Se calculó la sensibilidad relativa para el experimento utilizando el reactivo que contiene un estabilizador con respecto al experimento que utiliza el reactivo que no contiene estabilizador, suponiendo que  $\Delta A_0$ , obtenido utilizando el reactivo que no contiene estabilizador y utilizado sin almacenamiento, es de 100%. Los resultados se muestran en la figura 5.

25 Tal como se puede observar en la figura 5, la sensibilidad relativa disminuyó a 60% cuando no se utilizó un estabilizador, lo que indica el efecto de estabilización del reactivo proteolítico. En el experimento en el que se añadió un estabilizador, se observó el efecto de estabilización por la adición de cloruro de calcio, cloruro de sodio, DMSO, EtOH o TEALS. De éstos, cloruro de calcio y DMSO no mostraron casi ninguna disminución en el rendimiento. Se

30 continuó el experimento de estabilidad utilizando DMSO y cloruro de calcio, para encontrar que casi no se observó disminución en el rendimiento durante el almacenamiento durante 4 semanas a 37°C. Además, se confirmó que estos compuestos tienen un efecto de estabilidad en el almacenamiento durante un año o más, cuando se almacena en estado líquido en un refrigerador.

35 Ejemplo de Referencia 12

<Estabilización de la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado>

<Composición de la solución de reacción>

40 Reactivo proteolítico R-1

- 150 mM Solución tampón Tris-HCl (pH 8,5)
- 8 mM 4-aminoantipirina (fabricada por Dojindo Laboratories)
- 15 U/ml Peroxidasa

45 Reactivo R-2 de ensayo de aminoácidos glicosilados

- 150 mM Solución tampón Tris-HCl (pH 8,5)
- 24 U/ml R-FOD-II (fabricada por Asahi Kasei Corporation)
- 12 mM TODB (fabricado por Dojindo Laboratories) + Estabilizador de proteasa con varias concentraciones (se utilizó agua destilada como control)

Los siguientes compuestos 1) - 15) se utilizaron como estabilizantes para las enzimas que reaccionan, como mínimo, con un aminoácido glicosilado en el reactivo de ensayo de aminoácidos glicosilados.

- 50 1) 5% Manitol
- 2) 5% Sorbitol
- 3) 5% Sacarosa
- 4) 5% Trehalosa
- 5) 0,5 mM Cloruro de calcio
- 55 6) 0,5 mM Cloruro de magnesio
- 7) 3% Ácido L-glutámico (Glu)
- 8) 3% L-glutamina (Gln)
- 9) 3% L-prolina (Pro)
- 10) 3% L-alanina (Ala)

- 11) 3% L-valina (Val)
- 12) 3% Glicina (Gly)
- 13) 3% L-lisina (Lys)
- 14) 3% Sarcosina
- 5 15) 100 mM Sulfato de amonio

1) - 14) fabricados por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

<Muestra>

10 FZL 0,5 mM

<Procedimiento de reacción>

15 Se añadieron 8  $\mu$ l de una muestra a 240  $\mu$ l del reactivo proteolítico incubado a 37°C. La reacción se inició a 37°C y, exactamente 5 minutos después, se añadieron 80  $\mu$ l del reactivo de ensayo de aminoácidos glicosilados. Se midió la absorbancia a 546 nm antes de la adición del reactivo de ensayo de aminoácidos glicosilados y cinco minutos después de la adición del reactivo de ensayo de aminoácidos glicosilados. Se calculó  $\Delta A_0$  restando el cambio de absorbancia obtenido de una muestra blanco, utilizando agua destilada en lugar de la solución de sustrato, del cambio de absorbancia obtenido de la medición de absorbancia en la solución de sustrato. La misma solución de reacción de reactivo de ensayo de aminoácidos glicosilados se almacenó a 37°C durante dos días, y se midió la absorbancia de la misma manera. Se calculó  $\Delta A_{24}$  basándose en los resultados de la medición de absorbancia. Se calculó la sensibilidad relativa para el experimento utilizando el reactivo que contiene un estabilizador con respecto al experimento que utiliza el reactivo que no contiene estabilizador, suponiendo que  $\Delta A_0$ , obtenido utilizando el reactivo que no contiene estabilizador y utilizado sin almacenamiento, es de 100%. Los resultados se muestran en la figura 6.

30 Tal como se puede observar en la figura 6, la sensibilidad relativa disminuyó a 30% cuando no se utilizó estabilizador, lo que indica el efecto de estabilización del reactivo de ensayo de aminoácidos glicosilados. En el experimento en el que se añadió un estabilizador, se observó el efecto de estabilización por la adición de manitol, sorbitol, sacarosa, trehalosa, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, ácido L-glutámico, L-glutamina, L-prolina, L-alanina, L-valina, glicina, L-lisina, sarcosina y sulfato de amonio. De éstos, los alcoholes de azúcares, aminoácidos y sarcosina mostraron un efecto de estabilización particularmente fuerte. Se continuó el experimento de estabilidad utilizando L-alanina, glicina o sarcosina para encontrar que casi no se observó disminución en el rendimiento durante el almacenamiento por cuatro semanas a 37°C. Además, se confirmó que estos compuestos tienen un efecto de estabilidad en almacenamiento de uno o más años, cuando se almacenan en estado líquido en un refrigerador.

Ejemplo 13

40 <Preparación de biblioteca de ADN que contiene el gen FOD mutado>

45 La síntesis de un oligonucleótido que tiene la secuencia de bases de 1-30 en la secuencia de bases del listado de secuencias SEQ ID NO: 5 y un oligonucleótido que tiene la secuencia de bases de 1-30 en la secuencia de bases del listado de secuencias SEQ ID NO: 5 fueron consignada a BEX Co., Ltd. Se realizó una PCR utilizando un kit de Taq polimerasa (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.), utilizando ADN que codifica la proteína FOD obtenida de *Fusarium oxysporum* IFO-9972 como plantilla, según el manual adjunto al kit, amplificando así el gen estructural FOD. La reacción se llevó a cabo con la adición de iones de  $Mg^{++}$  equivalentes hasta la concentración final de 0,5 mM a la solución de reacción y a concentraciones de base distribuidas no uniforme de dATP: 0,51 mM, dCTP: 0,20 mM, dGTP: 1,15 mM y dTTP : 3,76 mM para promover la eficiencia de mutagénesis.

50 Ejemplo 14

<Preparación de biblioteca recombinante de FOD mutante>

55 Se digirieron fragmentos de ADN que contienen el gen FOD amplificado obtenido en el Ejemplo 13 con las endonucleasas de restricción *NcoI* y *EcoRI*, se incorporaron en el plásmido oTV119N (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.), se trató con las mismas endonucleasas de restricción y se introdujo en la cepa JM109 de *Escherichia coli* (fabricado por Toyobo Co., Ltd.). Las células se cultivaron durante toda la noche a 37°C en un medio de cultivo en placa agar LB (fabricado por DIFCO Co.), que contenía 100  $\mu$ g/ml de ampicilina, para formar colonias de un transformante.

Ejemplo 15

<Cribado de FOD mutado específicamente en la lisina>

65 Las colonias de la biblioteca preparada en el Ejemplo 14 fueron replicadas en dos láminas de medio de cultivo en

placa agar LB, cada una de las cuales contenía 100 µg/ml de ampicilina y 1 mM de IPTG (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Un medio de cultivo agar LB (0,3%) que contenía 5 U/ml de peroxidasa (fabricada por Asahi Kasei Corporation), 0,02% de ortodiansidina (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 2,0 mM de valina glicosilada o lisina glicosilada (preparadas por el método de Hashiba y otros. Hashiba, H. (1976) J. Agric. Food Chem., 24, 70) se estratificó sobre cada medio. Después de incubar a 37°C durante ocho horas, se observaron radicales de oxígeno formados por la oxidación de aminoácido glicosilado con FOD y la coloración de las colonias producida por la dianisidina. Se cribaron de esta manera las colonias teñidas de púrpura oscuro con lisina glicosilada y no teñidas con valina glicosilada y se obtuvieron 164 cepas de las colonias correspondientes.

#### 10 Ejemplo 16

<Preparación de fluido de extracto celular de cepas candidatas de FOD mutado>

15 Las 164 cepas de colonias mutantes obtenidas en el Ejemplo 15 se cultivaron durante 16 horas a 30° C en 1,5 ml de un medio líquido BHI 3,7% (fabricado por DIFCO Co.), que contenía 50 µg/ml de ampicilina y 1 mM de IPTG. Se centrifugó 1 ml del caldo de cultivo (15.000 g durante un minuto a 4°C) para recoger las células. Se añadieron 200 µl de solución tampón Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) a las células recogidas. Después de la ruptura de las células utilizando un dispositivo ultrasónico, se centrifugó la mezcla (14.000 g durante cinco minutos a 4°C) para obtener un extracto celular como un sobrenadante.

#### 20 Ejemplo 17

<Verificación de la especificidad de sustrato de la FOD mutado>

25 Se midió la especificidad de sustrato de aminoácidos glicosilados de la FOD mutada recombinante contenida en el extracto celular preparado en el Ejemplo 16, utilizando el método de medición de actividad enzimática de FOD mencionado anteriormente. Como resultado, se identificaron entre las cepas candidatas dos mutantes en los que la reactividad con valina glicosilada es menor de 1/1000 de la reactividad con lisina glicosilada. Estos se consideraron como los mutantes objetivo.

#### 30 Ejemplo 18

<Extracción de plásmido recombinante>

35 Los mutantes seleccionados en el Ejemplo 17 fueron inoculados en 1,5 ml de medio líquido LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina y se cultivaron con agitación a 37°C durante 16 horas. Los plásmidos se extrajeron según un método convencional. Estos plásmidos se nombraron pcmFOD1 y pcmFOD2.

#### 40 Ejemplo 19

<Determinación de la secuencia de bases de los genes de FOD mutante>

45 Se determinó la secuencia de bases de los genes de FOD mutante obtenidos en el Ejemplo 18, según el método de dideoxi. Como resultado, se encontró que los dos mutantes poseen la misma estructura, estando sustituida la A 1115 en la secuencia de bases indicada en la SEQ ID NO: 1 por G y estando sustituida lisina 372 en la secuencia de aminoácidos de la FOD mutante recombinante codificada en el listado de secuencias indicada como SEQ ID NO: 1 por arginina.

#### 50 Ejemplo 20

<Confirmación de la especificidad de sustrato de cada mutante>

55 Para observar el efecto de la sustitución con otros aminoácidos en el sitio del aminoácido mutado identificado en el Ejemplo 19, se llevó a cabo una mutagénesis dirigida al sitio, según el método de Kunkel y otros. La síntesis de un oligonucleótido que tiene la secuencia de bases de 1-27 en el listado de secuencias indicado como SEQ ID NO: 7 fue consignada a una fuente externa (BEX Co., Ltd.). El oligonucleótido se sometió a mutagénesis dirigida al sitio utilizando el kit Mutan-K (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.), según el manual adjunto al kit. El gen mutante obtenido se incorporó nuevamente en el plásmido de expresión pTV119N, se introdujo en el huésped *Escherichia coli* y se cultivó a 30°C durante 16 horas en un medio líquido BHI 3,7%, que contenía 50 µg/ml de ampicilina y 1 mM de IPTG para producir la proteína FOD mutante. La especificidad de sustrato se midió de la misma manera que en los Ejemplos 16 y 17, utilizando varios de los mutantes producidos mediante el experimento anterior, para encontrar que los mutantes sustituidos con triptófano, metionina, treonina, valina, alanina, serina, cisteína o glicina, distinto de arginina, muestran la misma especificidad de sustrato específica de lisina glicosilada que el mutante sustituido con arginina. Los resultados se muestran en la tabla 6.

65

Tabla 6

Reactivo Aminoácido 327	Kcat			Km/Ko		
	Sustrato aminoácido glicosilado		Proporción de reactividad	Sustrato aminoácido glicosilado		Proporción de reactividad
	Lisina (a)	Valina (b)	(a) / (b)	Lisina (a)	Valina (b)	(a) / (b)
Lisina (tipo salvaje)	14900	549	27,1	5650	596	9,5
Arginina	351	0,45	788	447	1,00	440
Triptófano	248	Por debajo del límite	-	319	0,11	2980
Metionina	853	1,14	745	638	0,46	1480
Valina	1470	1,04	1420	1940	1,01	1930
Treonina	952	0,47	2010	866	0,93	927
Alanina	1790	1,21	1480	N.D.	N.D.	N.D.
Serina	1250	1,68	747	N.D.	N.D.	N.D.
Cisteína	569	0,37	1560	N.D.	N.D.	N.D.
Glicina	271	0,74	365	N.D.	N.D.	N.D.

En la tabla, "por debajo del límite" indica "por debajo del límite de detección" y "N.D." indica que "no hay datos". Los resultados anteriores confirman que, si la lisina 372 en la secuencia de aminoácidos indicada en el listado de secuencias como SEQ ID N: 1 se sustituye por otro aminoácido, la reactividad de FOD con lisina glicosilada puede ser relativamente reducida en comparación con la reactividad con la valina glicosilada. En particular, se encontró que los mutantes obtenidos mediante la sustitución de la lisina con el triptófano, metionina o valina poseen una alta especificidad por la valina glicosilada y excelentes propiedades enzimáticas. El mutante obtenido mediante la sustitución de la lisina con triptófano fue nombrado FOD-W, el plásmido de expresión que produce los FOD-W se denominó pcmFOD3, el mutante obtenido por la sustitución de la lisina con metionina se nombró FOD-M, el plásmido de expresión que produce los FOD-M fue nombrado pcmFOD4, el mutante obtenido por la sustitución de la lisina con valina fue nombrado FOD-V y el plásmido de expresión que produce los FOD-V se denominó pcmFOD5. La figura 7 muestra una estructura común para los plásmidos.

#### 15 Ejemplo 21

<Ensayo de fructosil-L-valina (FV) después de eliminar  $\epsilon$ -fructosil-L-lisina (ZFL) en una muestra >

#### 20 Reactivo de reacción 1

50 mM Solución tampón Tris-HCl (pH 7,5)  
10 U/ml FOD-V  
5 U/ml Catalasa

#### Reactivo de reacción 2

50 mM Solución tampón Tris-HCl (pH 7,5)  
10 U/ml FOD  
20 U/ml Peroxidasa  
0,05% Azida sódica  
0,04% 4-aminoantipirina  
0,04% TOOS

25 Soluciones de muestra soluciones de ZFL 0,3 mM con FV añadido hasta a una concentración final de 0, 0,1, 0,2, ó 0,3 mM.

30 Después de precalentar 0,5 ml de la solución de reacción 1 a 37°C durante 5 minutos, se añadieron 0,05 ml de las soluciones de muestra anteriores y se hicieron reaccionar a 37°C durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 0,5 ml de la solución de reacción 2, y se midió la absorbancia a 555 nm 5 minutos después. Se utilizó agua destilada en lugar de solución de muestra para un ensayo en blanco. Como control, se procesó de la misma manera una solución de reacción 1, sin añadir FOD-V.

35 En la figura 8, círculos no rellenos indican los resultados obtenidos sin añadir FOD-V y los cuadrados no rellenos indican los resultados obtenidos añadiendo FOD-V.

Tal como puede observarse en la figura 8, la utilización combinada de FOD-V y FOD asegura la determinación cuantitativa de FV, después de eliminar ZFL en las soluciones de muestra.

Las secuencias de aminoácidos obtenidas mediante la sustitución de la lisina 372 en la secuencia de aminoácidos indicada en el listado de secuencias como SEQ ID NO: 1 con triptófano, metionina y valina se indican en el listado de secuencias como SEQ ID NO: 2, 3 y 4, respectivamente.

5 Ejemplo de Referencia 22

<Determinación de la proporción de albúmina glicosilada>

Reactivo proteolítico R-1

10

50 mM	Solución tampón ácido POPSO (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) pH 7,5
2500 U/ml	Proteasa de tipo XXIV (fabricada por Sigma-Aldrich Co.)
1%	Ácido sulfúrico-3-[(colamidopropil)-dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propano (fabricado por Sigma-Aldrich Co.)
5 U/ml	Oxidasa de ácido ascórbico (fabricada por Hoffmann-La Roche Ltd.)
5%	DMSO
5 mM	4-aminoantipirina

Reactivo de ensayo de aminoácidos glicosilados R-2

150 mM	Solución tampón ácido HEPES (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) pH 7,5
5 mM	TODB
10 U/ml	POD
20 U/ml	R-FOD-II
3%	Ácido glutámico

15 Reactivo de pretratamiento de albúmina R-3

10 mM	Solución tampón Tris-HCl (pH 8,0)
0,3%	Laurilsulfato sódico

Reactivo de coloración de albúmina R-4

200 mM	Solución tampón ácido succínico (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) pH 5,5
0,15 mM	Bromocresol púrpura (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)
0,3%	Tx-100 (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

20 <Muestra>

1. Suero sanguíneo de personas sanas y diabéticas, 35 muestras de cada una.
2. Se utilizó suero sanguíneo H controlado (fabricado por BML, Inc.) como calibrador.

25 La concentración de albúmina glicosilada del calibrador se ajustó previamente de manera que los resultados del ensayo de la muestra clínica mediante el método de HPLC y el método enzimático pueden coincidir. El valor de CRM470 se utilizó como valor de albúmina.

30 <Procedimiento de reacción>

35 Se añadieron 8 µl de una muestra a 240 µl de R-1 incubado a 37°C. La reacción se inició a 37°C y, exactamente cinco minutos después, se añadieron 80 µl de R-2. Se midió el cambio de absorbancia a 555 nm antes de la adición de R-2 y cinco minutos después de la adición de R-2. Se midieron el suero sanguíneo H controlado y agua destilada por separado para preparar una curva de calibración, en base a la cual se determinó la concentración de albúmina glicosilada en las muestras.

40 Se añadieron 2 µl de una muestra a 160 µl del reactivo de pretratamiento de albúmina R-3 incubado a 37°C. La reacción se inició a 37°C y, exactamente cinco minutos después, se añadieron 160 µl del reactivo de coloración de albúmina R-4. Se midió la absorbancia a 600 nm antes de la adición del reactivo de coloración de albúmina y cinco minutos después de la adición del reactivo de coloración de albúmina.

45 Se preparó una curva de calibración utilizando agua destilada y una muestra con una concentración conocida de albúmina, en lugar de la muestra, para medir la concentración de albúmina.

El GA (%) del método enzimático se determinó mediante la fórmula,  
 $GA (\%) = (\text{concentración de GA} / \text{concentración de albúmina}) \times 100.$

El valor según el método de HPLC se midió utilizando Hi-AUTO GAA-2000 (fabricado por ARKRAY, Inc.). Los resultados se muestran en la figura 9.

5 Tal como puede observarse en la figura 9, el método enzimático y método HPLC mostraron una excelente correlación de  $r = 0,998$ . Todos estos reactivos no mostraron ningún cambio en el comportamiento después de almacenado en estado líquido durante dos semanas a 37°C. En base a estos experimentos, se ha demostrado evidentemente que los reactivos determinan con precisión albúmina glicosilada y determinan la proporción de albúmina glicosilada al

- 10 1) evitar el efecto de los componentes de globulina y el ácido ascórbico,  
2) estabilizar las proteasas y enzimas que reaccionan, como mínimo, con un aminoácido glicosilado,  
3) determinar la albúmina con precisión, y  
4) evitar el efecto de la hemoglobina glicosilada.

15 Ejemplo 23

<Utilizando una enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado para el primer reactivo y una composición que contiene una proteasa como segundo reactivo >

20 R-1

200 mM	Solución tampón POPSO
5 mM	4-aminoantipirina
10 U/ml	POD
20 U/ml	R-FOD-II
5 U/ml	Oxidasa de ácido ascórbico
3%	Ácido glutámico

R-2

20 mM	Solución tampón de piperazina-1,4-bis(ácido 2-etanosulfónico)(pH 6,5)
20%	DMSO
8000 U/ml	Proteasa tipo XXIV
4%	Ácido sulfúrico-3-[(colamidopropil)-dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propano
5 mM	TODB

25

R-3, R-4 Los mismos que en el Ejemplo de Referencia 22.

<Muestra>

30 La misma muestra que en el Ejemplo de Referencia 22 y FZL de 10 a 200 µM

<Procedimiento de reacción>

El mismo que en el Ejemplo de Referencia 22.

35

Los resultados se muestran en la figura 10.

40 Tal como puede observarse en la figura 10, las proteínas glicosiladas se ensayaron de forma excelente en un corto tiempo de reacción de 10 minutos, incluso en el caso en que se añade una enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado al primer reactivo y se añade una proteasa al segundo reactivo. Además, incluso si está presente un aminoácido glicosilado en una muestra, el aminoácido glicosilado en la muestra se puede eliminar mediante la enzima que reacciona, como mínimo, con el aminoácido glicosilado formulado en R-1, permitiendo de esta manera que las proteínas glicosiladas sean ensayadas con precisión.

45 El reactivo de la presente invención mostró una buena correlación ( $R=0,99$ ) con el método de HPLC de:  
Método enzimático GA (%) = 1,03 x método de HPLC GA (%) - 0,3  
confirmando un ensayo preciso de proteínas glicosiladas. No hubo ninguna disminución en el comportamiento del reactivo de la presente invención después de almacenado durante tres semanas a 37°C o durante 15 meses en un refrigerador.

50

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

La proporción de proteínas glicosiladas y albúmina glicosilada en muestras puede determinarse con precisión mediante la presente invención. Por lo tanto, el método de la presente invención puede utilizarse eficazmente en inspección clínica.

55

COMENTARIOS SOBRE MATERIAL BIOLÓGICO DEPOSITADO

(1) (a) Nombre y dirección de la organización en la que se depositó el material biológico:

5 Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, Institución Administrativa Independiente

Dirección: Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki, 305-8566, Japón

(B) Fecha de depósito en la organización depositaria (a): 16 de enero de 2001

(C) Número de depósito otorgado por la organización depositaria (a): FERM BP-7847

10

(2) (a) Nombre y dirección de la organización en la que se depositó el material biológico:

Nombre: Depositario del Organismo Internacional de Patentes, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, Institución Administrativa Independiente

Dirección: Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki, 305-8566, Japón

15 (B) Fecha de depósito en la organización depositaria (a): 16 de enero de 2001

(C) Número de depósito otorgado por la organización depositaria (a): FERM BP-7848

# ES 2 391 802 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Yoshioka, Issei; Asahi Kasei Co., Ltd  
 <120> Composición para determinar proteínas glicosiladas  
 <130>  
 5 <150> JP 2001/ 22953  
     JP 2001/ 39796  
     JP 2001/ 24002  
 <151> 2001- 1-13  
     2001- 2-16  
 10 <151> 2001- 8- 8  
 <160> 7  
 <170>  
 <210> 1  
 <211> 1320  
 15 <212> ADN  
 <213> Fusarium oxysporum IF0-9722  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)... (1320)  
 20 <300>  
 <308> DDBJ E16562  
 <309> 1999-07-28  
 <310> JP 1998201473-A/1  
 <311> 1997-01-20  
 25 <312> 1998-08-04  
 <400> 1  
 gcc tca act ctc acc aaa cag tcc caa att ctc atc gtt ggt ggc gga 48  
 Ala Ser Thr Leu Thr Lys Gln Ser Gln Ile Leu Ile Val Gly Gly Gly  
 1                   5                   10                   15  
 30 act tgg gga tgc tca act gcc ctc cat ctc gcc cgt cgg ggt tac acc 96  
 Thr Trp Gly Cys Ser Thr Ala Leu His Leu Ala Arg Arg Gly Tyr Thr  
                   20                   25                   30  
 aac gtc act gtt ctc gat gtc aat cgc atc ccg tca ccg ata tca gcc 144  
 Asn Val Thr Val Leu Asp Val Asn Arg Ile Pro Ser Pro Ile Ser Ala  
 35                   35                   40                   45  
 ggg cat gat gta aac aaa ctt gct ggc cga ctg tgc act gcc gat agc 192  
 Gly His Asp Val Asn Lys Leu Ala Gly Arg Leu Ser Thr Ala Asp Ser  
           50                   55                   60  
 aaa ggt gat gat gaa gac tca atc tgg aaa gca ctt agc tac gcc gca 240  
 40 Lys Gly Asp Asp Glu Asp Ser Ile Trp Lys Ala Leu Ser Tyr Ala Ala  
 65                   70                   75                   80  
 gct caa gga tgg ctc cac gac cct gtc ttc caa cca ttc tgc cac aat 288  
 Ala Gln Gly Trp Leu His Asp Pro Val Phe Gln Pro Phe Cys His Asn  
                   85                   90                   95

ES 2 391 802 T3

	aca ggc tct gtc gtg gct ggc tca aca cca aag tct atc aag cag ctg	336
	Thr Gly Ser Val Val Ala Gly Ser Thr Pro Lys Ser Ile Lys Gln Leu	
	100 105 110	
	gta gaa gat gag atc ggt gac gac atc gac cag tat aca cct ctc aac	384
5	Val Glu Asp Glu Ile Gly Asp Asp Ile Asp Gln Tyr Thr Pro Leu Asn	
	115 120 125	
	aca gca gaa gat ttc aga aag acc atg cct gag ggt atc ctg aca ggt	432
	Thr Ala Glu Asp Phe Arg Lys Thr Met Pro Glu Gly Ile Leu Thr Gly	
	130 135 140	
10	aac ttt cca ggc tgg aag ggc ttt tac aag ccc acg ggt tct ggt tgg	480
	Asn Phe Pro Gly Trp Lys Gly Phe Tyr Lys Pro Thr Gly Ser Gly Trp	
	145 150 155 160	
	gtt cat gct cga aaa gct atg aaa gct gct ttc gaa gag agc gag agg	528
	Val His Ala Arg Lys Ala Met Lys Ala Ala Phe Glu Glu Ser Glu Arg	
15	165 170 175	
	ctt ggt gtc aaa ttc atc act ggc tct ccc gaa gga aag gtg gag agt	576
	Leu Gly Val Lys Phe Ile Thr Gly Ser Pro Glu Gly Lys Val Glu Ser	
	180 185 190	
	ctg atc ttt gaa gac ggc gat gtt cga ggt gcc aag acg gca gat ggt	624
20	Leu Ile Phe Glu Asp Gly Asp Val Arg Gly Ala Lys Thr Ala Asp Gly	
	195 200 205	
	aag gag cac aga gcg gat cga act att ctt tcc gct ggt gct tca gca	672
	Lys Glu His Arg Ala Asp Arg Thr Ile Leu Ser Ala Gly Ala Ser Ala	
	210 215 220	
25	gag ttc ttc ctc gat ttt gag aac cag atc cag cct acg gcg tgg acc	720
	Glu Phe Phe Leu Asp Phe Glu Asn Gln Ile Gln Pro Thr Ala Trp Thr	
	225 230 235 240	
	ctg ggc cat atc cag atg aca cca gaa gaa acc aag ctg tac aag aac	768
	Leu Gly His Ile Gln Ile Thr Pro Glu Glu Thr Lys Leu Tyr Lys Asn	
30	245 250 255	
	ctg cca cct ctt ttc aac atc aac caa ggt ttc ttc atg gaa cct gat	816
	Leu Pro Pro Leu Phe Asn Ile Asn Gln Gly Phe Phe Met Glu Pro Asp	
	260 265 270	
	gag gat ctt cat caa ctc aag atg tgc gat gaa cat ccg ggc tac tgc	864
35	Glu Asp Leu His Gln Leu Lys Met Cys Asp Glu His Pro Gly Tyr Cys	
	275 280 285	
	aac tgg gtt gaa aag cct ggt tct aag tac ccc cag tcc atc ccc ttc	912
	Asn Trp Val Glu Lys Pro Gly Ser Lys Tyr Pro Gln Ser Ile Pro Phe	
	290 295 300	
40	gca aag cat caa gtg cca acc gag gct gaa cga cgc atg aag cag ttt	960
	Ala Lys His Gln Val Pro Thr Glu Ala Glu Arg Arg Met Lys Gln Phe	
	305 310 315 320	
	ctg aaa gat atc atg cct cag ctt gca gat cgg ccg ctt gtt cat gct	1008
	Leu Lys Asp Ile Met Pro Gln Leu Ala Asp Arg Pro Leu Val His Ala	
45	325 330 335	

# ES 2 391 802 T3

```

cga atc tgc tgg tgc gct gat aca cag gat aga atg ttc ctg atc acc      1056
Arg Ile Cys Trp Cys Ala Asp Thr Gln Asp Arg Met Phe Leu Ile Thr
      340              345              350
tat cat cct cga cat ccc tca ctt gtc att gct tca ggt gat tgc ggc      1104
5 Tyr His Pro Arg His Pro Ser Leu Val Ile Ala Ser Gly Asp Cys Gly
      355              360              365
acg ggt tac aag cat atc aca tca att gga aag ttc atc tct gac tgt      1152
Thr Gly Tyr Lys His Ile Thr Ser Ile Gly Lys Phe Ile Ser Asp Cys
      370              375              380
10 atg gag ggt acg ctt gag gaa agg ttt gcc aag ttc tgg aga tgg cga      1200
Met Glu Gly Thr Leu Glu Glu Arg Phe Ala Lys Tyr Trp Arg Trp Arg
      385              390              395              400
cca gag aag ttt acc gag ttc tgg ggt aaa gat cct ctg gat cgg ttt      1248
Pro Glu Lys Phe Thr Glu Phe Trp Gly Lys Asp Pro Leu Asp Arg Phe
15              405              410              415
gga gct gac gat aag atc atg gat ttg ccc aag agt gat gta gag gga      1296
Gly Ala Asp Asp Lys Ile Met Asp Leu Pro Lys Ser Asp Val Glu Gly
      420              425              430
tgg aca aat atc aag aat gat atc      1320
20 Trp Thr Asn Ile Lys Asn Asp Ile
      435              440
<210> 2
<211> 1320
<212> ADN
25 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(1320)
30 <221> mutación
<222> (1114)...(1115)
<221> MUTÁGENO
<222> (372)
<400> 2
35 gcc tca act ctc acc aaa cag tcc caa att ctc atc gtt ggt ggc gga      48
Ala Ser Thr Leu Thr Lys Gln Ser Gln Ile Leu Ile Val Gly Gly Gly
      1              5              10              15
act tgg gga tgc tca act gcc ctc cat ctc gcc cgt cgg ggt tac acc      96
Thr Trp Gly Cys Ser Thr Ala Leu His Leu Ala Arg Arg Gly Tyr Thr
40              20              25              30
aac gtc act gtt ctc gat gtc aat cgc atc ccg tca ccg ata tca gcc      144
Asn Val Thr Val Leu Asp Val Asn Arg Ile Pro Ser Pro Ile Ser Ala
      35              40              45
ggg cat gat gta aac aaa ctt gct ggc cga ctg tcg act gcc gat agc      192
45 Gly His Asp Val Asn Lys Leu Ala Gly Arg Leu Ser Thr Ala Asp Ser

```

# ES 2 391 802 T3

	50	55	60	
	aaa ggt gat gat gaa gac tca atc tgg aaa gca ctt agc tac gcc gca			240
	Lys Gly Asp Asp Glu Asp Ser Ile Trp Lys Ala Leu Ser Tyr Ala Ala			
	65	70	75	80
5	gct caa gga tgg ctc cac gac cct gtc ttc caa cca ttc tgc cac aat			288
	Ala Gln Gly Trp Leu His Asp Pro Val Phe Gln Pro Phe Cys His Asn			
	85	90	95	
	aca ggc tct gtc gtg gct ggc tca aca cca aag tct atc aag cag ctg			336
	Thr Gly Ser Val Val Ala Gly Ser Thr Pro Lys Ser Ile Lys Gln Leu			
10	100	105	110	
	gta gaa gat gag atc ggt gac gac atc gac cag tat aca cct ctc aac			384
	Val Glu Asp Glu Ile Gly Asp Asp Ile Asp Gln Tyr Thr Pro Leu Asn			
	115	120	125	
	aca gca gaa gat ttc aga aag acc atg cct gag ggt atc ctg aca ggt			432
15	Thr Ala Glu Asp Phe Arg Lys Thr Met Pro Glu Gly Ile Leu Thr Gly			
	130	135	140	
	aac ttt cca ggc tgg aag ggc ttt tac aag ccc acg ggt tct ggt tgg			480
	Asn Phe Pro Gly Trp Lys Gly Phe Tyr Lys Pro Thr Gly Ser Gly Trp			
	145	150	155	160
20	gtt cat gct cga aaa gct atg aaa gct gct ttc gaa gag agc gag agg			528
	Val His Ala Arg Lys Ala Met Lys Ala Ala Phe Glu Glu Ser Glu Arg			
	165	170	175	
	ctt ggt gtc aaa ttc atc act ggc tct ccc gaa gga aag gtg gag agt			576
	Leu Gly Val Lys Phe Ile Thr Gly Ser Pro Glu Gly Lys Val Glu Ser			
25	180	185	190	
	ctg atc ttt gaa gac ggc gat gtt cga ggt gcc aag acg gca gat ggt			624
	Leu Ile Phe Glu Asp Gly Asp Val Arg Gly Ala Lys Thr Ala Asp Gly			
	195	200	205	
	aag gag cac aga gcg gat cga act att ctt tcc gct ggt gct tca gca			672
30	Lys Glu His Arg Ala Asp Arg Thr Ile Leu Ser Ala Gly Ala Ser Ala			
	210	215	220	
	gag ttc ttc ctc gat ttt gag aac cag atc cag cct acg gcg tgg acc			720
	Glu Phe Phe Leu Asp Phe Glu Asn Gln Ile Gln Pro Thr Ala Trp Thr			
	225	230	235	240
35	ctg ggc cat atc cag atg aca cca gaa gaa acc aag ctg tac aag aac			768
	Leu Gly His Ile Gln Ile Thr Pro Glu Glu Thr Lys Leu Tyr Lys Asn			
	245	250	255	
	ctg cca cct ctt ttc aac atc aac caa ggt ttc ttc atg gaa cct gat			816
	Leu Pro Pro Leu Phe Asn Ile Asn Gln Gly Phe Phe Met Glu Pro Asp			
40	260	265	270	
	gag gat ctt cat caa ctc aag atg tgc gat gaa cat ccg ggc tac tgc			864
	Glu Asp Leu His Gln Leu Lys Met Cys Asp Glu His Pro Gly Tyr Cys			
	275	280	285	
	aac tgg gtt gaa aag cct ggt tct aag tac ccc cag tcc atc ccc ttc			912
45	Asn Trp Val Glu Lys Pro Gly Ser Lys Tyr Pro Gln Ser Ile Pro Phe			



# ES 2 391 802 T3

	20	25	30	
	aac gtc act gtt ctc gat gtc aat cgc atc ccg tca ccg ata tca gcc			144
	Asn Val Thr Val Leu Asp Val Asn Arg Ile Pro Ser Pro Ile Ser Ala			
	35	40	45	
5	ggg cat gat gta aac aaa ctt gct ggc cga ctg tcg act gcc gat agc			192
	Gly His Asp Val Asn Lys Leu Ala Gly Arg Leu Ser Thr Ala Asp Ser			
	50	55	60	
	aaa ggt gat gat gaa gac tca atc tgg aaa gca ctt agc tac gcc gca			240
	Lys Gly Asp Asp Glu Asp Ser Ile Trp Lys Ala Leu Ser Tyr Ala Ala			
10	65	70	75	80
	gct caa gga tgg ctc cac gac cct gtc ttc caa cca ttc tgc cac aat			288
	Ala Gln Gly Trp Leu His Asp Pro Val Phe Gln Pro Phe Cys His Asn			
	85	90	95	
	aca ggc tct gtc gtg gct ggc tca aca cca aag tct atc aag cag ctg			336
15	Thr Gly Ser Val Val Ala Gly Ser Thr Pro Lys Ser Ile Lys Gln Leu			
	100	105	110	
	gta gaa gat gag atc ggt gac gac atc gac cag tat aca cct ctc aac			384
	Val Glu Asp Glu Ile Gly Asp Asp Ile Asp Gln Tyr Thr Pro Leu Asn			
	115	120	125	
20	aca gca gaa gat ttc aga aag acc atg cct gag ggt atc ctg aca ggt			432
	Thr Ala Glu Asp Phe Arg Lys Thr Met Pro Glu Gly Ile Leu Thr Gly			
	130	135	140	
	aac ttt cca ggc tgg aag ggc ttt tac aag ccc acg ggt tct ggt tgg			480
	Asn Phe Pro Gly Trp Lys Gly Phe Tyr Lys Pro Thr Gly Ser Gly Trp			
25	145	150	155	160
	gtt cat gct cga aaa gct atg aaa gct gct ttc gaa gag agc gag agg			528
	Val His Ala Arg Lys Ala Met Lys Ala Ala Phe Glu Glu Ser Glu Arg			
	165	170	175	
	ctt ggt gtc aaa ttc atc act ggc tct ccc gaa gga aag gtg gag agt			576
30	Leu Gly Val Lys Phe Ile Thr Gly Ser Pro Glu Gly Lys Val Glu Ser			
	180	185	190	
	ctg atc ttt gaa gac ggc gat gtt cga ggt gcc aag acg gca gat ggt			624
	Leu Ile Phe Glu Asp Gly Asp Val Arg Gly Ala Lys Thr Ala Asp Gly			
	195	200	205	
35	aag gag cac aga gcg gat cga act att ctt tcc gct ggt gct tca gca			672
	Lys Glu His Arg Ala Asp Arg Thr Ile Leu Ser Ala Gly Ala Ser Ala			
	210	215	220	
	gag ttc ttc ctc gat ttt gag aac cag atc cag cct acg gcg tgg acc			720
	Glu Phe Phe Leu Asp Phe Glu Asn Gln Ile Gln Pro Thr Ala Trp Thr			
40	225	230	235	240
	ctg ggc cat atc cag atg aca cca gaa gaa acc aag ctg tac aag aac			768
	Leu Gly His Ile Gln Ile Thr Pro Glu Glu Thr Lys Leu Tyr Lys Asn			
	245	250	255	
	ctg cca cct ctt ttc aac atc aac caa ggt ttc ttc atg gaa cct gat			816
45	Leu Pro Pro Leu Phe Asn Ile Asn Gln Gly Phe Phe Met Glu Pro Asp			

# ES 2 391 802 T3

	260	265	270	
	gag gat ctt cat caa ctc aag atg tgc gat gaa cat ccg ggc tac tgc			864
	Glu Asp Leu His Gln Leu Lys Met Cys Asp Glu His Pro Gly Tyr Cys			
	275	280	285	
5	aac tgg gtt gaa aag cct ggt tct aag tac ccc cag tcc atc ccc ttc			912
	Asn Trp Val Glu Lys Pro Gly Ser Lys Tyr Pro Gln Ser Ile Pro Phe			
	290	295	300	
	gca aag cat caa gtg cca acc gag gct gaa cga cgc atg aag cag ttt			960
	Ala Lys His Gln Val Pro Thr Glu Ala Glu Arg Arg Met Lys Gln Phe			
10	305	310	315	320
	ctg aaa gat atc atg cct cag ctt gca gat cgg ccg ctt gtt cat gct			1008
	Leu Lys Asp Ile Met Pro Gln Leu Ala Asp Arg Pro Leu Val His Ala			
	325	330	335	
	cga atc tgc tgg tgc gct gat aca cag gat aga atg ttc ctg atc acc			1056
15	Arg Ile Cys Trp Cys Ala Asp Thr Gln Asp Arg Met Phe Leu Ile Thr			
	340	345	350	
	tat cat cct cga cat ccc tca ctt gtc att gct tca ggt gat tgc ggc			1104
	Tyr His Pro Arg His Pro Ser Leu Val Ile Ala Ser Gly Asp Cys Gly			
	355	360	365	
20	acg ggt tac atg cat atc aca tca att gga aag ttc atc tct gac tgt			1152
	Thr Gly Tyr Met His Ile Thr Ser Ile Gly Lys Phe Ile Ser Asp Cys			
	370	375	380	
	atg gag ggt acg ctt gag gaa agg ttt gcc aag ttc tgg aga tgg cga			1200
	Met Glu Gly Thr Leu Glu Glu Arg Phe Ala Lys Tyr Trp Arg Trp Arg			
25	385	390	395	400
	cca gag aag ttt acc gag ttc tgg ggt aaa gat cct ctg gat cgg ttt			1248
	Pro Glu Lys Phe Thr Glu Phe Trp Gly Lys Asp Pro Leu Asp Arg Phe			
	405	410	415	
	gga gct gac gat aag atc atg gat ttg ccc aag agt gat gta gag gga			1296
30	Gly Ala Asp Asp Lys Ile Met Asp Leu Pro Lys Ser Asp Val Glu Gly			
	420	425	430	
	tgg aca aat atc aag aat gat atc			1320
	Trp Thr Asn Ile Lys Asn Asp Ile			
	435	440		
35	<210> 4			
	<211> 1320			
	<212> ADN			
	<213> Secuencia Artificial			
	<220>			
40	<221> CDS			
	<222> (1)...(1320)			
	<221> mutación			
	<222> (1114)...(1115)			
	<221> MUTÁGENO			
45	<222> (372)			

ES 2 391 802 T3

```

<400> 4
gcc tca act ctc acc aaa cag tcc caa att ctc atc gtt ggt ggc gga      48
Ala Ser Thr Leu Thr Lys Gln Ser Gln Ile Leu Ile Val Gly Gly Gly
1           5           10           15
5  act tgg gga tgc tca act gcc ctc cat ctc gcc cgt cgg ggt tac acc      96
Thr Trp Gly Cys Ser Thr Ala Leu His Leu Ala Arg Arg Gly Tyr Thr
           20           25           30
aac gtc act gtt ctc gat gtc aat cgc atc ccg tca ccg ata tca gcc      144
Asn Val Thr Val Leu Asp Val Asn Arg Ile Pro Ser Pro Ile Ser Ala
10          35           40           45
ggg cat gat gta aac aaa ctt gct ggc cga ctg tcg act gcc gat agc      192
Gly His Asp Val Asn Lys Leu Ala Gly Arg Leu Ser Thr Ala Asp Ser
           50           55           60
aaa ggt gat gat gaa gac tca atc tgg aaa gca ctt agc tac gcc gca      240
15  Lys Gly Asp Asp Glu Asp Ser Ile Trp Lys Ala Leu Ser Tyr Ala Ala
           65           70           75           80
gct caa gga tgg ctc cac gac cct gtc ttc caa cca ttc tgc cac aat      288
Ala Gln Gly Trp Leu His Asp Pro Val Phe Gln Pro Phe Cys His Asn
           85           90           95
20  aca ggc tct gtc gtg gct ggc tca aca cca aag tct atc aag cag ctg      336
Thr Gly Ser Val Val Ala Gly Ser Thr Pro Lys Ser Ile Lys Gln Leu
           100          105          110
gta gaa gat gag atc ggt gac gac atc gac cag tat aca cct ctc aac      384
Val Glu Asp Glu Ile Gly Asp Asp Ile Asp Gln Tyr Thr Pro Leu Asn
25          115          120          125
aca gca gaa gat ttc aga aag acc atg cct gag ggt atc ctg aca ggt      432
Thr Ala Glu Asp Phe Arg Lys Thr Met Pro Glu Gly Ile Leu Thr Gly
           130          135          140
aac ttt cca ggc tgg aag ggc ttt tac aag ccc acg ggt tct ggt tgg      480
30  Asn Phe Pro Gly Trp Lys Gly Phe Tyr Lys Pro Thr Gly Ser Gly Trp
           145          150          155          160
gtt cat gct cga aaa gct atg aaa gct gct ttc gaa gag agc gag agg      528
Val His Ala Arg Lys Ala Met Lys Ala Ala Phe Glu Glu Ser Glu Arg
           165          170          175
35  ctt ggt gtc aaa ttc atc act ggc tct ccc gaa gga aag gtg gag agt      576
Leu Gly Val Lys Phe Ile Thr Gly Ser Pro Glu Gly Lys Val Glu Ser
           180          185          190
ctg atc ttt gaa gac ggc gat gtt cga ggt gcc aag acg gca gat ggt      624
Leu Ile Phe Glu Asp Gly Asp Val Arg Gly Ala Lys Thr Ala Asp Gly
40          195          200          205
aag gag cac aga gcg gat cga act att ctt tcc gct ggt gct tca gca      672
Lys Glu His Arg Ala Asp Arg Thr Ile Leu Ser Ala Gly Ala Ser Ala
           210          215          220
gag ttc ttc ctc gat ttt gag aac cag atc cag cct acg gcg tgg acc      720
45  Glu Phe Phe Leu Asp Phe Glu Asn Gln Ile Gln Pro Thr Ala Trp Thr

```

# ES 2 391 802 T3

	225	230	235	240	
	ctg ggc cat atc cag atg aca cca gaa gaa acc aag ctg tac aag aac				768
	Leu Gly His Ile Gln Ile Thr Pro Glu Glu Thr Lys Leu Tyr Lys Asn				
		245	250	255	
5	ctg cca cct ctt ttc aac atc aac caa ggt ttc ttc atg gaa cct gat				816
	Leu Pro Pro Leu Phe Asn Ile Asn Gln Gly Phe Phe Met Glu Pro Asp				
		260	265	270	
	gag gat ctt cat caa ctc aag atg tgc gat gaa cat ccg ggc tac tgc				864
	Glu Asp Leu His Gln Leu Lys Met Cys Asp Glu His Pro Gly Tyr Cys				
10		275	280	285	
	aac tgg gtt gaa aag cct ggt tct aag tac ccc cag tcc atc ccc ttc				912
	Asn Trp Val Glu Lys Pro Gly Ser Lys Tyr Pro Gln Ser Ile Pro Phe				
		290	295	300	
	gca aag cat caa gtg cca acc gag gct gaa cga cgc atg aag cag ttt				960
15	Ala Lys His Gln Val Pro Thr Glu Ala Glu Arg Arg Met Lys Gln Phe				
		305	310	315	320
	ctg aaa gat atc atg cct cag ctt gca gat cgg ccg ctt gtt cat gct				1008
	Leu Lys Asp Ile Met Pro Gln Leu Ala Asp Arg Pro Leu Val His Ala				
		325	330	335	
20	cga atc tgc tgg tgc gct gat aca cag gat aga atg ttc ctg atc acc				1056
	Arg Ile Cys Trp Cys Ala Asp Thr Gln Asp Arg Met Phe Leu Ile Thr				
		340	345	350	
	tat cat cct cga cat ccc tca ctt gtc att gct tca ggt gat tgc ggc				1104
	Tyr His Pro Arg His Pro Ser Leu Val Ile Ala Ser Gly Asp Cys Gly				
25		355	360	365	
	acg ggt tac gtg cat atc aca tca att gga aag ttc atc tct gac tgt				1152
	Thr Gly Tyr Val His Ile Thr Ser Ile Gly Lys Phe Ile Ser Asp Cys				
		370	375	380	
	atg gag ggt acg ctt gag gaa agg ttt gcc aag ttc tgg aga tgg cga				1200
30	Met Glu Gly Thr Leu Glu Glu Arg Phe Ala Lys Tyr Trp Arg Trp Arg				
		385	390	395	400
	cca gag aag ttt acc gag ttc tgg ggt aaa gat cct ctg gat cgg ttt				1248
	Pro Glu Lys Phe Thr Glu Phe Trp Gly Lys Asp Pro Leu Asp Arg Phe				
		405	410	415	
35	gga gct gac gat aag atc atg gat ttg ccc aag agt gat gta gag gga				1296
	Gly Ala Asp Asp Lys Ile Met Asp Leu Pro Lys Ser Asp Val Glu Gly				
		420	425	430	
	tgg aca aat atc aag aat gat atc				1320
	Trp Thr Asn Ile Lys Asn Asp Ile				
40		435	440		
	<210> 5				
	<211> 30				
	<212> ADN				
	<213> Secuencia Artificial				
45	<220>				

# ES 2 391 802 T3

<223> Cebador de PCR  
<400> 5  
aaaacccatgg cctcaactct caccaaacag 30

5 <210> 6  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>

10 <223> Cebador de PCR  
<400> 6  
aaaaagaatt cagatatcat tcttgatatt 30

<210> 7  
15 <211> 27  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Cebador de mutagénesis dirigida a sitio

20 <400> 7  
ggcacgggtt acnscatat cacatca 27

**REIVINDICACIONES**

1. Método de ensayo de proteínas glicosiladas utilizando una proteasa y una enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado, que comprende hacer reaccionar la muestra con la enzima que reacciona, como  
5 mínimo, con un aminoácido glicosilado y, a continuación, con la proteasa, en el que se excluye

que se añade una fructosil-aminoácido-oxidasa a la muestra después de hacer reaccionar la muestra con la proteasa, en el caso que la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado, es fructosil-  
10 aminoácido-oxidasa.

Fig. 1

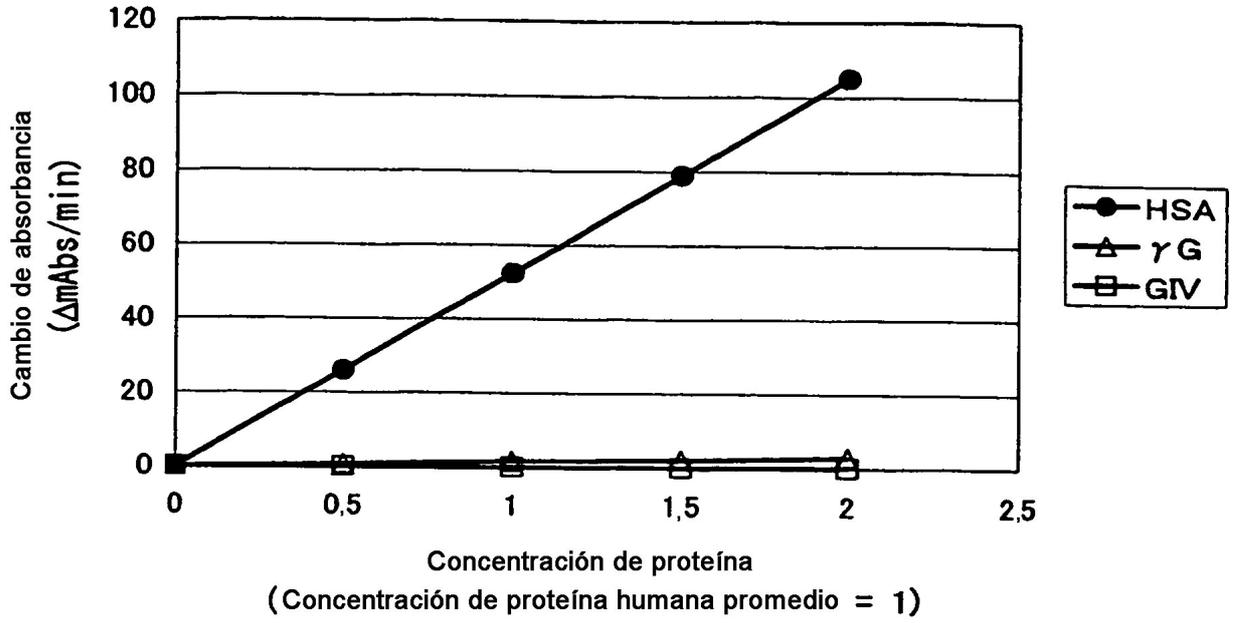


Fig. 2

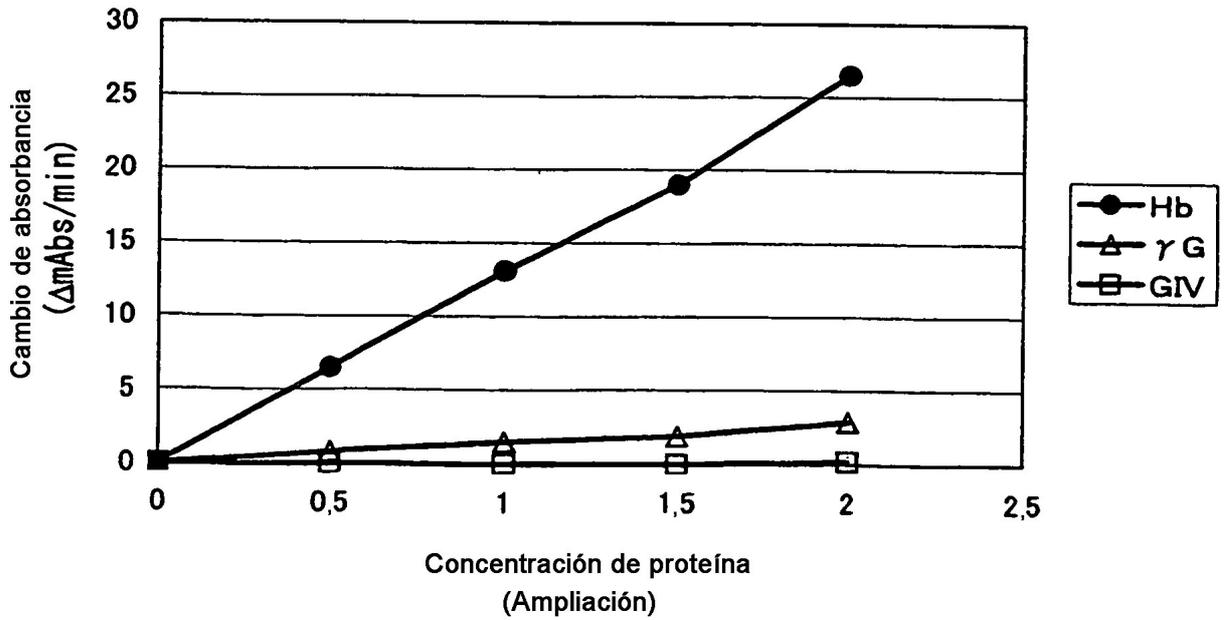


Fig. 3 Linealidad en el ensayo de GA

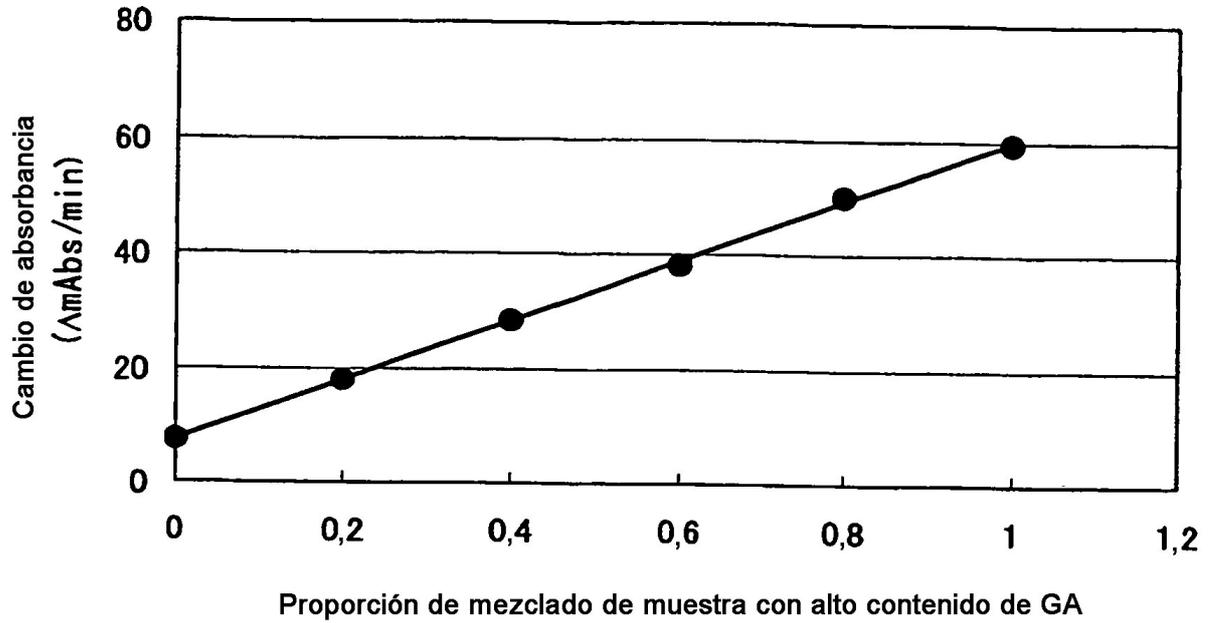
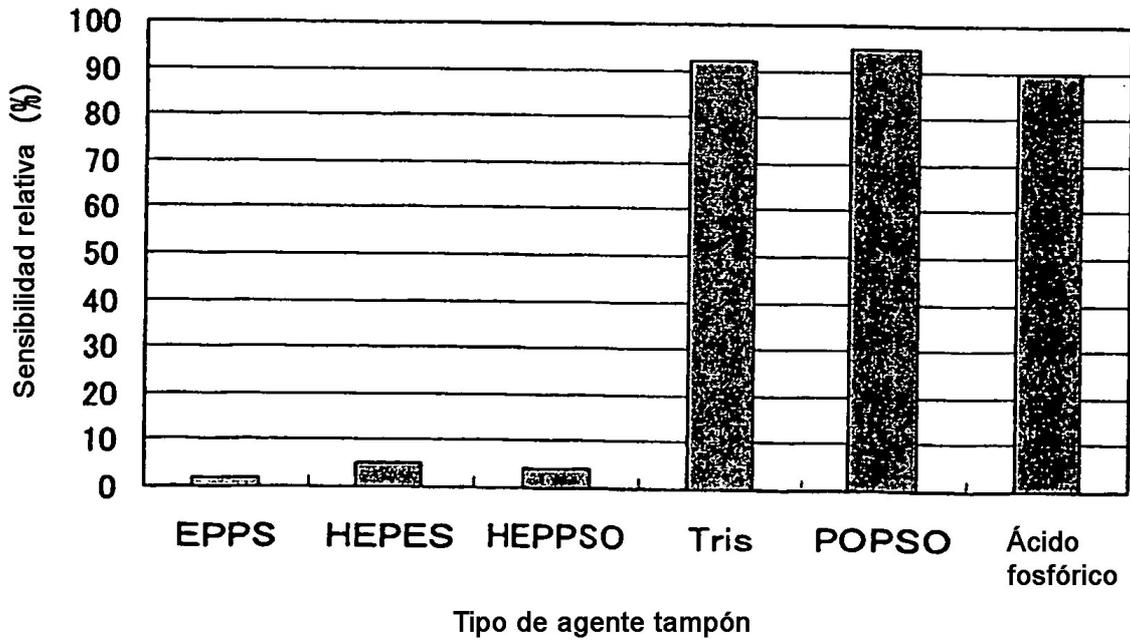
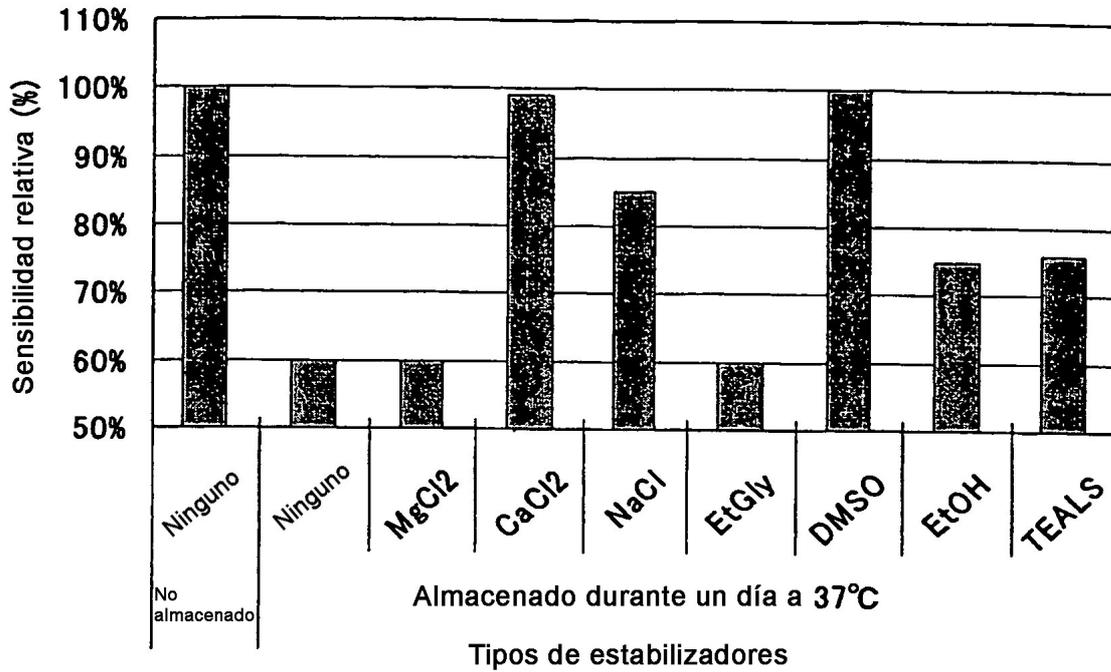


Fig. 4 Efecto del estabilizador y estabilidad de almacenamiento del reactivo de pretratamiento



**Fig. 5** Efecto del estabilizador y estabilidad de almacenamiento del reactivo de pretratamiento



**Fig. 6** Estabilización del estabilizador de aminoácidos glicosilados

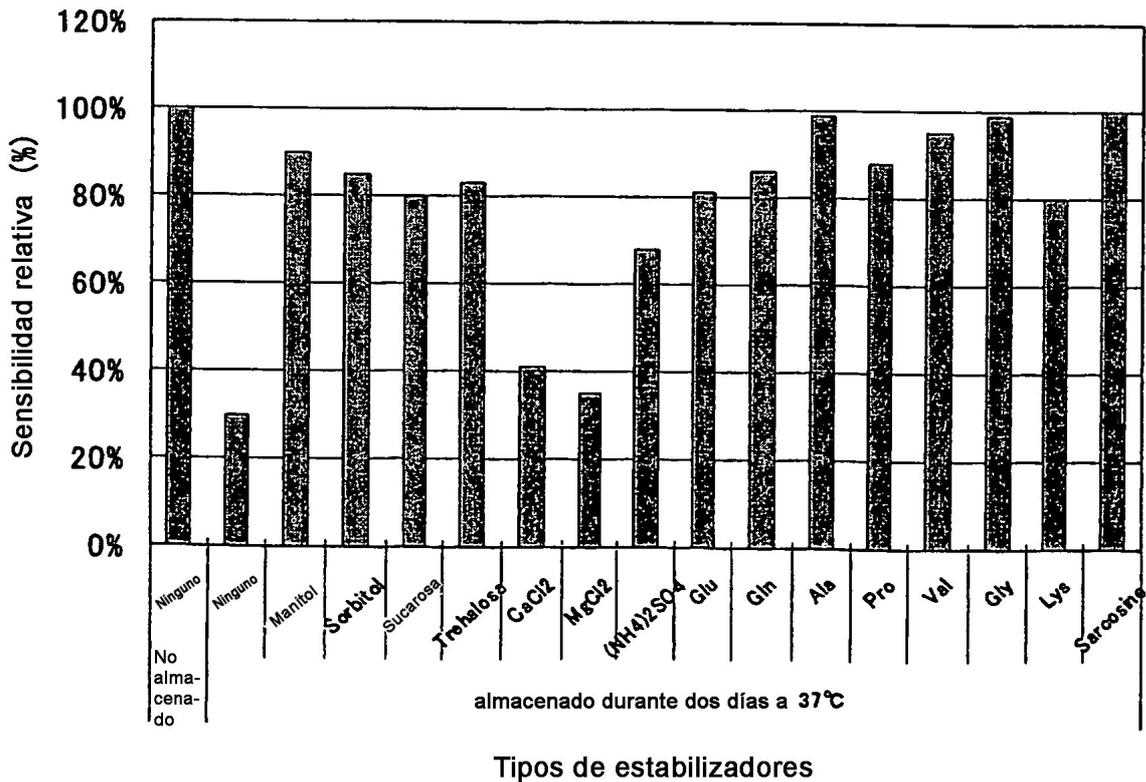


Fig. 7

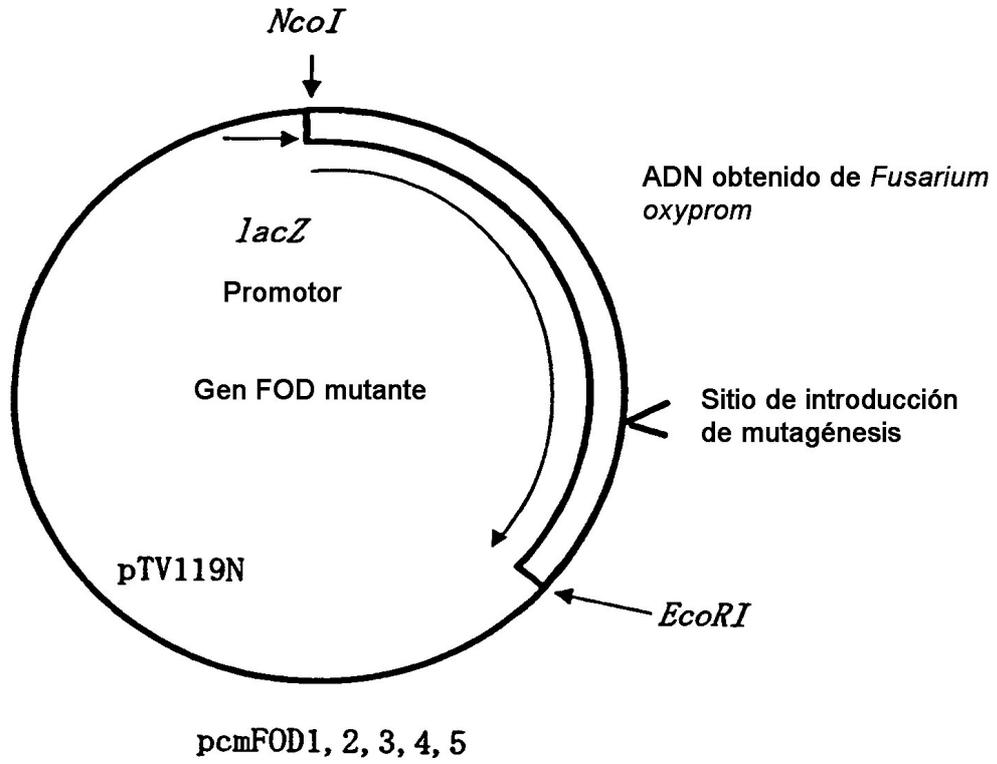


Fig. 8

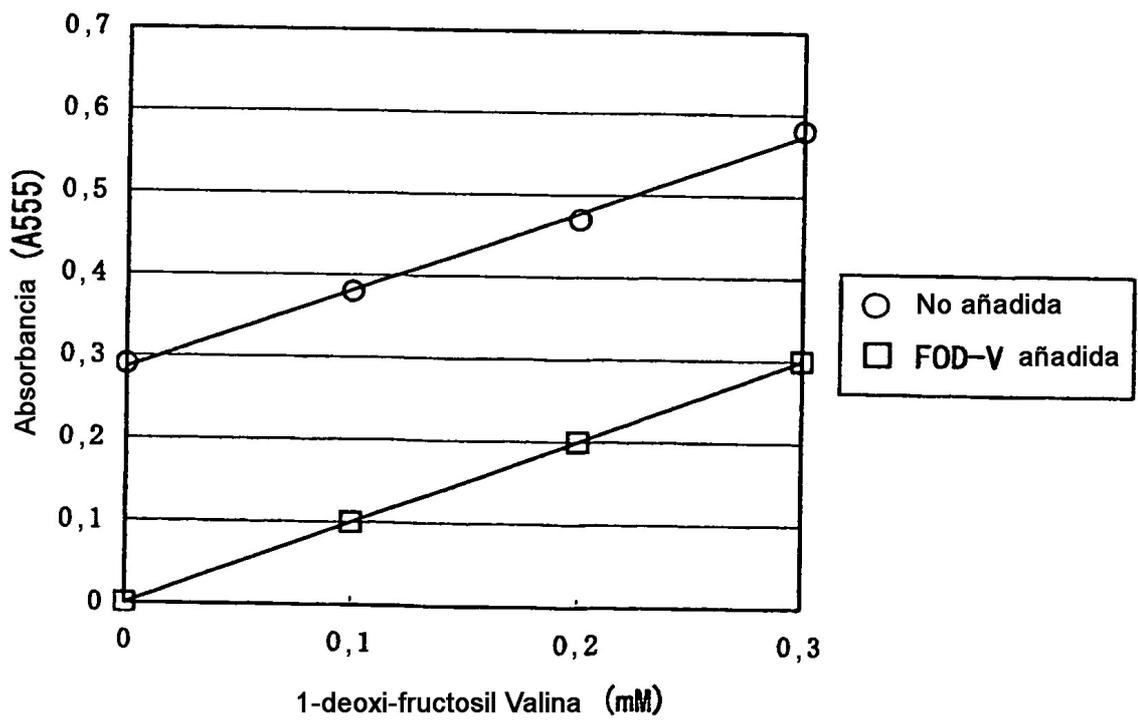


Fig. 9 Correlación entre el método de HPLC y el método enzimático

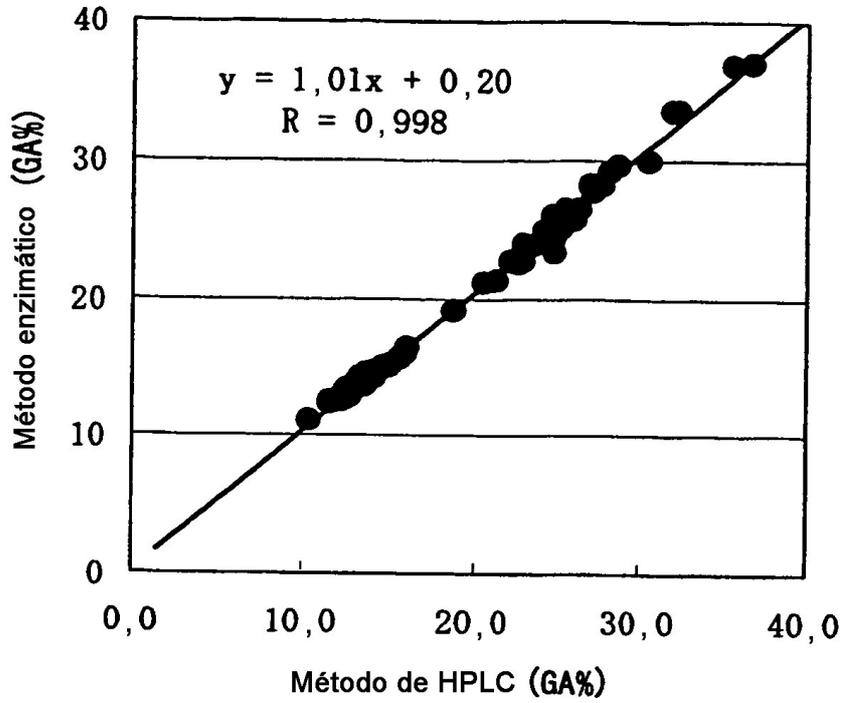


Fig. 10 Curva de reacción para la composición que utiliza el segundo reactivo que contiene proteasa

