

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 059**

51 Int. Cl.:

G01N 33/72 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2007 E 07810786 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013 EP 2044444**

54 Título: **Procedimientos para analizar el porcentaje de hemoglobina glicada**

30 Prioridad:

25.07.2006 US 833390 P
13.11.2006 US 858809 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.05.2013

73 Titular/es:

GENERAL ATOMICS (100.0%)
3550 GENERAL ATOMICS COURT, P.O. BOX
85608
SAN DIEGO, CA 92186, US

72 Inventor/es:

YUAN, CHONG-SHENG;
LIU, LIMIN y
DATTA, ABHIJIT

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 404 059 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

Procedimientos para analizar el porcentaje de hemoglobina glicada

5 **Declaración respecto a la investigación o desarrollo financiados federalmente**

No aplicable

10 **Campo de la invención**

La invención proporciona un ensayo enzimático directo para determinar el porcentaje de hemoglobina glicada en una muestra de sangre.

15 **Antecedentes de la invención**

Una proteína glicada es una sustancia que se produce mediante la unión no enzimática e irreversible del grupo amino de un aminoácido constituyente de una proteína con el grupo aldehído de un azúcar reductor tal como aldosa. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.127.138. Dicha reacción de unión no enzimática e irreversible también se denomina "reorganización de Amadori" y, por tanto, la proteína glicada mencionada anteriormente puede también denominarse "compuesto de Amadori" en algunos casos.

Se ha implicado a la glicación no enzimática de proteínas en el desarrollo de ciertas enfermedades, por ejemplo complicaciones diabéticas y el proceso de envejecimiento (Takahashi y col., J. Biol. Chem., 272(19): 12505 - 7 (1997); y Baynes y Monnier, Prog. Clin. Biol. Res., 304: 1 - 41 0 (1989)). Esta reacción conlleva la disfunción de moléculas diana a través de la formación de aductos de azúcar y reticulaciones. Se ha centrado un considerable interés en el producto de Amadori, que es la modificación "temprana" más importante durante la glicación no enzimática *in vitro* e *in vivo*.

Se conocen varios ensayos para proteínas glicadas. Por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.127.138 divulga que una muestra que contiene una proteína glicada se trata con la proteasa XIV o una proteasa de *Aspergillus genus*, después (o mientras se está tratando la muestra con la proteasa anterior) se hace reaccionar la FAOD (fructosil aminoácido oxidasa) con la muestra con el fin de medir la cantidad de oxígeno consumido por la reacción de FAOD o la cantidad del producto de reacción resultante para medir, de este modo, la proteína glicada.

En otro ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.008.006 divulga que la cantidad de proteínas glicadas en una muestra se pueden cuantificar haciendo reaccionar la muestra con, en primer lugar, un reactivo que es una combinación de una proteasa y una peroxidasa y, en segundo lugar, con una cetoaminoxidasa. La patente de EE.UU. N° 6.008.006 también divulga un kit que contiene el reactivo combinado enzimático peroxidasa/proteasa y, también, la cetoamino oxidasa. La publicación de EE.UU. N° 2005/0014935 también divulga procedimientos y kits para medir la cantidad de proteína glicada usando una amadoriasa química. La publicación de EE.UU. N° 2003/0162242 y el documento EP 1304385 A1 también divulga procedimientos de determinar de forma selectiva la hemoglobina glicada. Sakurabayashi y col., ("New enzymatic assay for Glycohemoglobin", Clinical Chemistry 49(2):269 - 274 (2003)) divulgan un procedimiento para determinar la hemoglobina glicada a través de la proporción de las concentraciones de hemoglobina glicada y hemoglobina total en la muestra.

Procedimientos descritos anteriormente para determinar el porcentaje de hemoglobina glicada A1c requieren una medición aparte de la hemoglobina total en las muestras. Cuando se usa un analizador químico para determinar el valor del porcentaje de hemoglobina glicada A1c se requiere un formato de canal doble. En este formato se realizan dos ensayos distintos para determinar 1) la concentración de hemoglobina glicada A1c y 2) la concentración de hemoglobina total en las muestras; y seguido del cálculo de la proporción entre la HbA1c glicada y la hemoglobina total para obtener el porcentaje de HbA1c.

Todas las patentes, solicitudes de patente y publicaciones citadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad.

55 **Sumario de la invención**

La invención proporciona procedimientos para la determinación directa del porcentaje de hemoglobina glicada en una muestra de sangre sin la necesidad de una medición separada de la hemoglobina total en la muestra. Dado que no hay necesidad de una medición separada de la hemoglobina total y no hay necesidad de una etapa de cálculo de la proporción, los presentes procedimientos se pueden automatizar por completo y usar con varios analizadores químicos en un formato de un solo canal.

En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para analizar directamente el porcentaje de hemoglobina glicada total o el porcentaje de hemoglobina glicada A1c en una muestra de sangre sin medir la hemoglobina total en la muestra de sangre en un procedimiento aparte, comprendiendo dicho procedimiento: a)

poner en contacto fragmentos proteicos que contienen péptidos glicosados o aminoácidos glicosados con una fructosil aminoácido oxidasa para generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2), donde los fragmentos proteicos se generan poniendo en contacto la muestra de sangre con 1) un tampón de lisis que libera hemoglobina de los glóbulos rojos en la muestra de sangre; 2) un primer agente oxidante que oxida de forma selectiva las sustancias reductoras de bajo peso molecular; 3) un segundo agente oxidante que oxida de forma selectiva las sustancias reductoras de alto peso molecular, donde el primer agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en peryodinato de Dess-Martin, N-etilmaleimida, yodoacetato sódico, peryodato sódico y cloramina-T, y el segundo agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en una sal de tetrazolio, dodecilsulfato sódico, ferricianuro potásico (III) y yodato potásico, y 4) una proteasa que digiere la hemoglobina glicosada en péptidos glicosados o aminoácidos glicosados; b) poner en contacto el H_2O_2 generado en la etapa a) con una sustancia formadora de color en presencia de una peroxidasa para generar una señal cuantificable; y c) determinar el porcentaje de hemoglobina glicosada total o el porcentaje de hemoglobina glicosada A1c en la muestra aplicando la señal generada en la etapa b) a una curva de calibración sin medir la hemoglobina total en la muestra de sangre por separado.

En algunas realizaciones, el primer agente oxidante es peryodinato de Dess-Martin o N-etilmaleimida y donde el segundo agente oxidante es una sal de tetrazolio.

En algunas realizaciones, el tampón de lisis contiene el primer agente oxidante y/o el segundo agente oxidante. En algunas realizaciones, el tampón de lisis contiene el primer agente oxidante, el segundo agente oxidante y la proteasa. En algunas realizaciones, el tampón de lisis contiene la proteasa.

En algunas realizaciones, el primer agente oxidante y el segundo agente oxidante están formulados en una única composición. En algunas realizaciones, el primer agente oxidante y el segundo agente oxidante están formulados en una composición separada. En algunas realizaciones, la proteasa está formulada en una única composición con el primer agente oxidante o el segundo agente oxidante. En algunas realizaciones, el primer agente oxidante, el segundo agente oxidante y la proteasa están formulados en una única composición. En algunas realizaciones, la fructosil aminoácido oxidasa, la peroxidasa y la sustancia formadora de color están formulados en una única composición.

En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para analizar directamente el porcentaje de hemoglobina glicosada total o el porcentaje de hemoglobina glicosada A1c en una muestra de sangre sin medir la hemoglobina total en la muestra de sangre en un procedimiento aparte, comprendiendo dicho procedimiento: a) poner en contacto fragmentos proteicos que contienen péptidos glicosados o aminoácidos glicosados con una fructosil aminoácido oxidasa de la SEC ID N° 1 como se define en la reivindicación 16 para generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2), donde los fragmentos proteicos se generan poniendo en contacto la muestra de sangre con 1) un tampón de lisis que libera hemoglobina de los glóbulos rojos en la muestra de sangre; 2) un agente oxidante que es una sal de tetrazolio y 3) una proteasa que digiere la hemoglobina glicosada en péptidos glicosados o aminoácidos glicosados; b) poner en contacto el H_2O_2 generado en la etapa a) con una sustancia formadora de color en presencia de una peroxidasa para generar una señal cuantificable; y c) determinar el porcentaje de hemoglobina glicosada total o el porcentaje de hemoglobina glicosada A1c en la muestra aplicando la señal generada en la etapa b) a una curva de calibración sin medir la hemoglobina total en la muestra de sangre por separado.

En algunas realizaciones, el tampón de lisis contiene el agente oxidante. En algunas realizaciones, el tampón de lisis contiene la proteasa. En algunas realizaciones, el agente oxidante y la proteasa están formulados en una única composición.

En algunas realizaciones, la sal de tetrazolio es sal monosódica de 2-(4-yodofenil)-3-(2,4-dinitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio o sal monosódica de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio.

En algunas realizaciones, la sustancia formadora de color es la sal de sodio de N-carboximetilaminocarbonil)-4,4'-bis(dimetilamino)-difenilamina (DA-64), la sal hexasódica de N,N,N',N'',N''-Hexa(3-sulfopropil)-4,4',4'',-triaminotrifetilmetano (TPM-PS) o la sal de sodio de 10-(carboximetilaminocarbonil)-3,7-bis(dimetilamino)-fenotiazina (DA-67).

En algunas realizaciones, la muestra de sangre es una muestra de sangre entera o de sangre recogida.

En algunas realizaciones, la proteasa es una proteasa de tipo endoproteasa o una proteasa de tipo exoproteasa. En algunas realizaciones, la proteasa se selecciona del grupo que consiste en proteinasa K, pronasa E, ananina, termolisina, subtilisina y proteasas de páncreas de vaca. En algunas realizaciones, la proteasa es una proteasa neutra de origen en *Aspergillus* o *Bacillus*. En algunas realizaciones, la proteasa genera un péptido glicosado de aproximadamente 2 a aproximadamente 30 residuos aminoácidos. En algunas realizaciones, la proteasa genera un residuo de glicina glicosada, valina glicosada o lisina glicosada o un péptido glicosado que comprende un residuo de glicina glicosada, valina glicosada o lisina glicosada.

En algunas realizaciones, la peroxidasa es peroxidasa de rábano.

En algunas realizaciones, los fragmentos proteicos que contienen el péptido glicado o el aminoácido glicado se ponen en contacto con la fructosil aminoácido oxidasa y la peroxidasa secuencialmente o simultáneamente.

5 En algunas realizaciones del primer procedimiento, la fructosil aminoácido oxidasa comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N°

(MGGSGDDDDLALAVTKSSSLIVGAGTWGTSTALHLARRGYTNVTVLDPYPVPSAI
 SAGNDVNKVISSGQYSNNKDEIEVNEILAEAFNGWKNDPLFKPYYHDTGLLMSACS
 QEGLDRLGVRVRPGEDPNLVELTRPEQFRKLAPEGVLQGDFFGWKGYFARSGAGW
 (MGGSGDDDDLALAVTKSSSLIVGAGTWGTSTALHLARRGYTNVTVLDPYPVPSAI
 SAGNDVNKVISSGQYSNNKDEIEVNEILAEAFNGWKNDPLFKPYYHDTGLLMSACS
 QEGLDRLGVRVRPGEDPNLVELTRPEQFRKLAPEGVLQGDFFGWKGYFARSGAGW
 QKIHELKWNPDIAANRNWRDTLGRFGGPNRVMDFHDVKEWTNVQYRDISKCLKGEL
 EGLPIPNNLLRTGHHHHHH).

10 En algunas realizaciones, el procedimiento se usa en el pronóstico o diagnóstico de una enfermedad o trastorno. En algunas realizaciones, la enfermedad o trastorno es la diabetes.

15 En otro aspecto, la invención proporciona kits para analizar directamente el porcentaje de hemoglobina glicada total o el porcentaje de hemoglobina glicada A1c en una muestra de sangre sin la necesidad de una medición aparte del contenido de hemoglobina total en muestras de sangre, que comprende: a) un tampón de lisis que lisa las células sanguíneas para liberar hemoglobina; b) un primer agente oxidante que oxida de forma selectiva las sustancias reductoras de bajo peso molecular, donde el primer agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en peryodinano de Dess-Martin, N-etilmaleimida, yodoacetato sódico, peryodato sódico y cloramina-T; c) un segundo agente oxidante que oxida de forma selectiva las sustancias reductoras de alto peso molecular donde el segundo agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en una sal de tetrazolio, dodecilsulfato sódico, ferricianuro potásico (III) y yodato potásico, d) una proteasa que hidroliza la hemoglobina en fragmentos proteicos que contienen péptidos glicosados o aminoácidos glicosados; e) una fructosil aminoácido oxidasa que reacciona con péptidos glicosados y aminoácidos glicosados para generar peróxido de hidrógeno (H₂O₂); f) una peroxidasa y una sustancia formadora de color; y g) calibrador(es) con un porcentaje conocido de hemoglobina glicada o un porcentaje conocido de hemoglobina glicada A1c para usar en la construcción de una curva de calibración. El kit puede comprender además instrucciones para realizar los procedimientos descritos en el presente documento.

25 En algunas realizaciones, el primer agente oxidante y/o el segundo agente oxidante están contenidos en el tampón de lisis. En algunas realizaciones, el primer agente oxidante y/o el segundo agente oxidante están contenidos en el mismo tampón con la proteasa.

Breve descripción de las varias vistas de la o las figuras

35 La Figura 1 muestra la línea temporal del procedimiento de ensayo enzimático de HbA1c de un solo canal.

La Figura 2 muestra una curva de calibración para el ensayo enzimático de la HbA1c. En el eje X se muestra el porcentaje de hemoglobina A1c glicada conocido para la muestra de calibración y en el eje Y se muestra la correspondiente diferencia en el valor de la absorbancia a 700 nm entre 8 minutos y 5 minutos después de añadir los reactivos R1a y R1b.

40 La figura 3 muestra la correlación entre el ensayo enzimático de hemoglobina A1c de un canal descrito en el Ejemplo 1 y el procedimiento HPLC de Tosoh. En el eje Y se muestra el valor de HbA1c medido usando el ensayo enzimático de hemoglobina A1c de un canal descrito en el Ejemplo 1 para las muestras; y en el eje X se muestra el valor de HbA1c medido usando el procedimiento de HPLC de Tosoh para las muestras correspondientes.

45 La Figura 4 muestra una curva de calibración para el ensayo enzimático de la HbA1c usando un agente oxidante como se describe en el Ejemplo 2. En el eje X se muestra el porcentaje de hemoglobina A1c glicada conocido para la muestra de calibración y en el eje Y se muestra la correspondiente diferencia en el valor de la absorbancia a 700 nm entre 8 minutos y 5 minutos después de añadir los reactivos R1a y R1b.

Descripción detallada de la invención

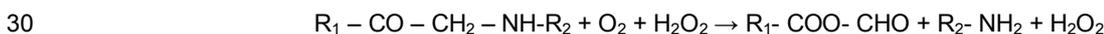
La invención proporciona procedimientos enzimáticos para la determinación directa del porcentaje de hemoglobina glicada en muestras de sangre sin la necesidad de una medición separada del contenido de hemoglobina total en las muestras de sangre. En un aspecto, el procedimiento usa dos tipos de agentes oxidantes que oxidan de forma selectiva sustancias reductoras de bajo peso molecular (principalmente ácido ascórbico y moléculas libres que contienen tio) y sustancias reductoras de alto peso molecular (principalmente hemoglobina) en muestras de sangre, acoplados con reacciones enzimáticas catalizadas por proteasas, fructosil aminoácido oxidasa y peroxidasa. En otro aspecto, el procedimiento usa un tipo de agente oxidante que oxida de forma selectiva sustancias reductoras de alto peso molecular en muestras de sangre, acoplado con reacciones enzimáticas catalizadas por proteasas, fructosil aminoácido oxidasa y peroxidasa. La invención también proporciona kits para realizar los procedimientos de la invención.

A. Definiciones

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece entiende habitualmente. Todas las patentes, solicitudes de patente, solicitudes publicadas y otras publicaciones a las que se hace referencia en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad. Si una definición establecida en esta sección es contraria o, por de otro modo, inconsistente con una definición establecida en las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones que se incorporan en el presente documento por referencia, la definición establecida en esta sección prevalece sobre la definición que se incorpora en el presente documento por referencia.

Como se usa en el presente documento, "un/uno" o "una" significa "al menos uno/una" o "uno/una o más".

Como se usa en el presente documento, una "fructosil aminoácido oxidasa" (FAOD) se refiere a una enzima que cataliza la desglicación oxidativa de productos de Amadori para dar los correspondientes aminoácidos, glucosona y H₂O₂, como se muestra en la reacción siguiente:



donde R₁ representa el residuo aldosa de un azúcar reductor y R₃ representa un residuo de un aminoácido, proteína o péptido. Otros sinónimos de amadoriasa incluyen amadoriasa, fructosilamina : oxígeno oxidorreductasa (FAOD) y fructosil valina oxidasa (FVO). Para los fines del presente documento, el nombre "fructosil aminoácido oxidasa" se usa en el presente documento, aunque se contemplan todos los sinónimos químicos del mismo. "Fructosil aminoácido oxidasa" también abarca un fragmento funcional o un derivado que sigue conservando sustancialmente su actividad enzimática que cataliza la desglicación oxidativa de los productos de Amadori para dar los correspondientes aminoácidos, glucosona y H₂O₂. Normalmente, un fragmento o derivado funcional conserva al menos el 50 % de su actividad amadoriasa. Preferentemente, un fragmento o derivado funcional conserva al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % de su actividad amadoriasa. También se pretende que una Fructosil aminoácido oxidasa pueda incluir sustituciones conservadoras de aminoácidos que no alteren sustancialmente su actividad. Los expertos en la técnica conocen sustituciones conservadoras adecuadas de aminoácidos y, en general, se pueden efectuar sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en la técnica reconocen que, en general, las sustituciones de un solo aminoácido en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson, y col., Molecular Biology of the Gene, 4^a Edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., pág. 224). Dichas sustituciones de ejemplo se realizan, preferentemente, de acuerdo con las indicadas en la TABLA 1, del siguiente modo:

TABLA 1
Residuo original Sustitución conservadora

Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys
Asn (N)	Gin; His
Cys (C)	Ser
Gin (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gin
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gin; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr

Residuo original Sustitución conservadora

Tyr (Y)

Trp; Phe

Val (V)

Ile; Leu

También se permiten otras sustituciones y se pueden determinar empíricamente de acuerdo con sustituciones conservadoras conocidas.

5 Como se usa en el presente documento, “peroxidasa” se refiere a una enzima que cataliza un huésped de reacciones en las que el peróxido de hidrógeno es un agente oxidante específico y una amplia gama de sustratos actúan como donantes de electrones. Se pretende que abarquen una peroxidasa con sustituciones conservadoras de aminoácidos que no alteran sustancialmente su actividad. La principal peroxidasa disponible comercialmente es la peroxidasa de rábano.

10 Como se usa en el presente documento, una “composición” hace referencia a cualquier mezcla de dos o más productos o compuestos. Puede ser una solución, una suspensión, un líquido, un polvo, una pasta, acuoso, no acuoso o cualquier combinación de los mismos.

15 B. Procedimientos de analizar directamente el porcentaje de hemoglobina glicada

En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para analizar directamente el porcentaje de hemoglobina glicada total o el porcentaje de hemoglobina glicada A1c en una muestra de sangre sin medir la hemoglobina total en la muestra de sangre en un procedimiento aparte, comprendiendo dicho procedimiento: a) 20 poner en contacto fragmentos proteicos que contienen péptidos glicosados o aminoácidos glicosados con una fructosil aminoácido oxidasa para generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2), donde los fragmentos proteicos se generan poniendo en contacto la muestra de sangre con 1) un tampón de lisis que libera hemoglobina de los glóbulos rojos en la muestra de sangre; 2) un primer agente oxidante que oxida de forma selectiva las sustancias reductoras de bajo peso molecular; 3) un segundo agente oxidante que oxida de forma selectiva las sustancias reductoras de alto peso molecular y 4) una proteasa que digiere la hemoglobina glicada en péptidos glicosados o aminoácidos glicosados, 25 donde el primer agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en peryodinano de Dess-Martin, N-etilmaleimida, yodoacetato sódico, peryodato sódico y cloramina-T, y el segundo agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en una sal de tetrazolio, dodecilsulfato sódico, ferricianuro potásico (III) y yodato potásico, b) poner en contacto el H_2O_2 generado en la etapa a) con una sustancia formadora de color en presencia de una peroxidasa para generar una señal cuantificable; y c) determinar el porcentaje de hemoglobina glicada total o el porcentaje de hemoglobina glicada A1c en la muestra aplicando la señal generada en la etapa b) a una curva de calibración sin medir la hemoglobina total en la muestra de sangre por separado.

En otro aspecto, la presente invención está dirigida a un procedimiento para analizar directamente el porcentaje de hemoglobina glicada total o el porcentaje de hemoglobina A1c glicada, comprendiendo dicho procedimiento: a) lisar los glóbulos rojos en una muestra de sangre con un tampón de lisis para liberar hemoglobina; b) oxidar el lisado con un primer agente oxidante que oxida de forma selectiva sustancias reductoras de bajo peso molecular; c) oxidar el lisado con un segundo agente oxidante que oxida de forma selectiva sustancias reductoras de alto peso molecular; 35 d) poner en contacto el lisado con una proteasa para formar fragmentos proteicos que contienen péptidos glicosados y/o aminoácidos glicosados; e) poner en contacto los fragmentos proteicos con una fructosil aminoácido oxidasa para generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2); f) permitir la oxidación de una sustancia formadora de color por el H_2O_2 generado en la etapa e) en presencia de una peroxidasa con la reacción de Trinder y mediante el segundo agente oxidante sin reaccionar para generar una señal cuantificable; y g) evaluar la señal generada en la etapa f); y h) 40 determinar el porcentaje de hemoglobina glicada total o el porcentaje de hemoglobina A1c glicada en la muestra comparando la señal con una curva de calibración sin medir la hemoglobina total en la muestra de sangre por separado, donde el primer agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en peryodinano de Dess-Marin, N-etilmaleimida, yodoacetato sódico, peryodato sódico y cloramina T, y el segundo agente oxidante se selecciona del grupo consistente en una sal de tetrazolio, dodecilsulfato sódico, ferricianuro potásico (III) y yodato potásico.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para analizar directamente el porcentaje de hemoglobina glicada total o el porcentaje de hemoglobina A1c glicada, comprendiendo dicho procedimiento: a) lisar los glóbulos rojos en una muestra de sangre con un tampón de lisis para liberar hemoglobina; b) oxidar el lisado con un primer agente oxidante, donde el primer agente oxidante es peryodinano de Dess-Marin y/o N-etilmaleimida; c) oxidar el lisado con un segundo agente oxidante, donde el segundo agente oxidante es una sal de tetrazolio; d) poner en contacto el lisado con una proteasa para formar fragmentos proteicos que contienen péptidos glicosados y/o aminoácidos glicosados; e) poner en contacto los fragmentos proteicos con una fructosil aminoácido oxidasa para generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2); f) permitir la oxidación de una sustancia formadora de color por el H_2O_2 generado en la etapa e) en presencia de una peroxidasa con la reacción de Trinder para generar una señal cuantificable; g) evaluar la señal generada en la etapa f); y h) determinar el porcentaje de hemoglobina glicada total o el porcentaje de hemoglobina A1c glicada en la muestra comparando la señal con una curva de calibración sin medir la hemoglobina total en la muestra de sangre por separado.

La muestra de sangre se puede lisar, oxidar por el primer agente oxidante, oxidar por el segundo agente oxidante y el fragmento se puede lisar mediante la proteasa de forma simultánea o en etapas separadas. Cualquier combinación de dos o más de las etapas se puede realizar de forma simultánea. En algunas realizaciones, las etapas que implican lisar los glóbulos rojos en la muestra y oxidar mediante el primer agente oxidante, lisar los glóbulos rojos y oxidar mediante el segundo agente oxidante, oxidar con el primer agente oxidante y el segundo agente oxidante o lisar los glóbulos rojos y oxidar con el primer agente oxidante y el segundo agente oxidante se pueden realizar de forma simultánea. En algunas realizaciones, las etapas que implican lisar los glóbulos rojos y fragmentar el lisado mediante la proteasa, oxidar con el primer agente oxidante y fragmentar el lisado con la proteasa, oxidar con el segundo agente oxidante y fragmentar el lisado con la proteasa u oxidar con el primer agente oxidante y el segundo agente oxidante y fragmentar el lisado con la proteasa se pueden realizar de forma simultánea. En algunas realizaciones, las etapas que implican lisar los glóbulos rojos, oxidar con el primer agente oxidante y el segundo agente oxidante y fragmentar el lisado se realizan de forma simultánea. En algunas realizaciones, el primer agente oxidante y/o el segundo agente oxidante están contenidos en el tampón de lisis o se añaden a la muestra de sangre al mismo tiempo que se añade el tampón de lisis. En algunas realizaciones, la proteasa también se incluye en el tampón de lisis con el primero y el segundo agentes oxidantes o se añade a la muestra de sangre al mismo tiempo que se añaden a la muestra de sangre el tampón de lisis y el primero y el segundo agentes oxidantes. En algunas realizaciones, el primer y/o el segundo agente oxidante están en la misma solución con la solución de proteasa antes de añadirlos al lisado de glóbulos rojos. En algunas realizaciones, el primer agente oxidante y el tampón de lisis están formulados en una única composición. En algunas realizaciones, la proteasa y el primer agente oxidante o el segundo agente oxidante están formulados en una única composición. En algunas realizaciones, el primero y el segundo agentes oxidantes están formulados en una única composición. En algunas realizaciones, el primero y el segundo agentes oxidantes están formulados en una composición aparte. En algunas realizaciones, el tampón de lisis contiene la proteasa o la proteasa se añade a la muestra de sangre al mismo tiempo que se añade el tampón de lisis.

El primer agente oxidante es un tipo de agente oxidante que oxida de forma selectiva sustancias reductoras de bajo peso molecular ($PM < 3.000$). El primer agente oxidante tiene una mayor potencia de oxidación hacia sustancias reductoras de bajo peso molecular que sustancias reductoras de alto peso molecular ($PM > 3.000$). Ejemplos de sustancias de bajo peso molecular en la muestra de sangre son ácido ascórbico y moléculas que contienen tio libre. Ejemplos del primer agente oxidante son peryodinano de Dess-Martin y N-etilmaleimida. Otros ejemplos de primeros agentes oxidantes son yodoacetato sódico, peryodato sódico y cloramina T. En algunas realizaciones se usan más de un primer agente oxidante (p. ej., tanto peryodinano de Dess-Martin como N-etilmaleimida).

El segundo agente oxidante es un tipo de agente oxidante que oxida de forma selectiva sustancias reductoras de alto peso molecular ($PM > 3.000$). El segundo agente oxidante tiene una mayor potencia de oxidación hacia sustancias reductoras de alto peso molecular que hacia sustancias reductoras de bajo peso molecular. Un ejemplo de sustancias reductoras de alto peso molecular en la muestra de sangre es la hemoglobina. Un ejemplo del segundo agente oxidante es una sal de tetrazolio es sal de tetrazolio (p. ej., sal monosódica de 2-(4-yodofenil)-3-(2,4-dinitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio o sal monosódica de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio). Otros ejemplos del segundo agente oxidante son dodecilsulfato sódico, ferricianuro potásico (III) y yodato potásico. En algunas realizaciones se puede usar más de un segundo agente oxidante.

En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para analizar directamente el porcentaje de hemoglobina glicada total o el porcentaje de hemoglobina glicada A1c en una muestra de sangre sin medir la hemoglobina total en la muestra de sangre en un procedimiento aparte, comprendiendo dicho procedimiento: a) poner en contacto fragmentos proteicos que contienen péptidos glicosados o aminoácidos glicosados con una fructosil aminoácido oxidasa para generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2), donde los fragmentos proteicos se generan poniendo en contacto la muestra de sangre con 1) un tampón de lisis que libera hemoglobina de los glóbulos rojos en la muestra de sangre; 2) un agente oxidante que es una sal de tetrazolio y 3) una proteasa que digiere la hemoglobina glicada en péptidos glicosados o aminoácidos glicosados, donde la fructosil aminoácido oxidasa comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 1 o es un fragmento o un derivado funcional de una fructosil aminoácido oxidasa que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 1, donde el fragmento o derivado funcional conserva al menos el 90 % de la actividad de la fructosil aminoácido oxidasa que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 1; b) poner en contacto el H_2O_2 generado en la etapa a) con una sustancia formadora de color en presencia de una peroxidasa para generar una señal cuantificable; y c) determinar el porcentaje de hemoglobina glicada total o el porcentaje de hemoglobina A1c glicada en la muestra aplicando la señal generada en la etapa b) a una curva de calibración sin medir la hemoglobina total en la muestra de sangre por separado. Puede usarse cualquier sal de tetrazolio descrita en el presente documento. Las etapas a) y b) se pueden realizar de forma secuencial o simultánea. En algunas realizaciones, el tampón de lisis contiene el agente oxidante. En algunas realizaciones, el tampón de lisis contiene la proteasa. En algunas realizaciones, el tampón de lisis contiene el agente oxidante y la proteasa. En algunas realizaciones, el agente oxidante y la proteasa están formulados en una única composición.

Las muestras de sangre que se pueden analizar usando los presentes procedimientos incluyen células de sangre entera o de sangre recogida. Los glóbulos rojos en la muestra de sangre se lisan en un tampón de lisis para liberar hemoglobina. Se puede usar cualquier tampón de lisis (p. ej., en los intervalos de pH ácido o alcalino) que puede

lisar los glóbulos rojos y liberar la hemoglobina. El tampón de lisis generalmente contiene un detergente, tal como Triton (p.ej., Triton X-100), Tween (p.ej., Tween 20), dodecilsulfato sódico (SOS), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), bromuro de tetradeciltrimetilamonio (TTAB), éteres de polioxietileno (POE) y Nonidet P-40 (NP-40).

5 En los presentes procedimientos se puede usar cualquier proteasa adecuada. Se puede usar una proteasa de tipo endoproteasa o una proteasa de tipo exoproteasa. Proteasas de tipo endoproteasa de ejemplo incluyen tripsina, α -quimotripsina, subtilisina, proteinasa K, papaína, catepsina B, pepsina, termolisina, proteasa XVII, proteasa XXI, lisil-endopeptidasa, proléter y bromelaina F. Ejemplos de proteasas de tipo exoproteasa incluyen una aminopeptidasa o una carboxipeptidasa. En un ejemplo, la proteasa es proteinasa K, pronasa E, ananina, termolisina, subtilisina o
10 proteasas de páncreas de vaca. También se pueden usar metaloproteasas y proteinasas neutras de especies de *Aspergillus*, especies de *Alicyclobacillus*, especies de *Bacillus*.

La proteasa se puede usar para generar un péptido glicado de cualquier tamaño adecuado. Por ejemplo, la proteasa se puede usar para generar un péptido glicado de aproximadamente 2 a aproximadamente 30 residuos
15 aminoácidos. En otro ejemplo, la proteasa se usa para generar un residuo de glicina glicada, valina glicada o lisina glicada o un péptido glicado que comprende un residuo de glicina glicada, valina glicada o lisina glicada.

El péptido glicado y/o el aminoácido glicado se ponen en contacto con una fructosil aminoácido oxidasa. Se puede usar cualquier fructosil aminoácido oxidasa (FAOD). La fructosil aminoácido oxidasa se puede purificar o producir de forma recombinante. Se puede usar cualquier especie natural. En un ejemplo, la FAOD usada procede de especies de *Aspergillus* (véase, por ejemplo, Takahashi y col., *J. Biol. Chem.* 272(6):3437-43, 1997). También se pueden usar otras fructosil aminoácido oxidasa, por ejemplo la divulgada en GenBank con el N° de acceso U82830 (Takahashi y col., *J. Biol. Chem.*, 272(19):12505-12507 (1997) y las divulgadas en la patente de EE.UU. N° 6.127.138. También se puede usar un fragmento o un derivado funcional de una amadoriasa que sigue conservando sustancialmente su actividad enzimática que cataliza la desglucación oxidativa de los productos de Amadori para dar los correspondientes aminoácidos, glucosona y H₂O₂.
20
25

Normalmente, un fragmento o derivado funcional de una amadoriasa conserva al menos el 50 % de su actividad enzimática. Preferentemente, un fragmento o derivado funcional de una amadoriasa conserva al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % de su actividad enzimática.
30

Se puede usar cualquiera de las proteínas quiméricas que tengan actividades enzimáticas de FAOD descritas en la publicación de EE.UU. N° 2005/0014935. En algunas realizaciones, la fructosil aminoácido oxidasa comprende desde el extremo N al extremo C. a) un primer fragmento peptídico que comprende una secuencia líder bacteriana de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 residuos aminoácidos; y b) un segundo fragmento peptídico que comprende una FAOD. En algunas realizaciones, la FAOD comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:
35

**MGGSGDDDDLALAVTKSSLLIVGAGTWGTSTALHLARRGYTNVTVLDPYPVPSAISAG
NDVNVKVISSGQYSNNKDEIEVNEILAEAEAFNGWKNDPLFKPYHDTGLLMSACSQEGLD
RLGVRVRPGEDPNLVELTRPEQFRKLAPEGVLQGDFFGWKGYFARSGAGWAHARNAL
VAAAREAQRMGVVKFVTGTPQGRVVTLIFENNDVKGAVTGDGKIWRAERTFLCAGASA
GQFLDFKNQLRPTAWTLVHIALKPEERALYKNIPVIFNIERGFFFEPDEERGEIKICDEHPG
YTNMVQSADGTMMSIPFEKTQIPKEAETRVRALLKETMPQLADRPFSFARICWCADTAN
REFLIDRHPQYHSLVLGCGASGRGFKYLPSIGNLIVDAMEGKVPQKIHILIKWNPDIAAN
RNWRDTLGRFGGPNRVMDFHDVKEWTNVQYRDISKLGEGLEGLPIPPLLRTGHHHHH
H (SEC ID N° 1)**

40 La proteína quimérica se puede producir en células bacterianas, tales como *E. coli*. La proteína producida se puede purificar y analizar sus actividades enzimáticas. Los ensayos de las actividades enzimáticas de la FAOD se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Takahashi y col., *J. Biol. Chem.* 272(6):3437-43, (1997) y la patente de EE.UU. N° 6.127,138). En Takahashi y col., *J. Biol. Chem.* 272(6):3437-43, (1997) se divulgan cuatro ensayos de ejemplo de las actividades enzimáticas de amadoriasas.
45

El peróxido de hidrógeno generado en la reacción catalizada por la fructosil aminoácido oxidasa se evalúa mediante la reacción de Trinder. En la reacción se añade una sustancia formadora de color y una peroxidasa, el peróxido de hidrógeno oxida la sustancia formadora de color para formar una sustancia de color tal como quinoneimina o derivados verdes de Bindschedler y H₂O. La cantidad de quinoneimina o del producto verde de Bindschedler generado se puede determinar midiendo la absorbancia entre aproximadamente 500 nm a aproximadamente 800 nm (tal como aproximadamente 700 nm). Sin desear quedar ligado a teoría alguna, el segundo agente oxidante no
50

reacciona con la sustancia de alto peso molecular en el lisado de sangre también puede reaccionar con la sustancia formadora de color hasta obtener el producto coloreado y, por tanto, la absorbancia medida refleja el porcentaje de hemoglobina glicada total y el porcentaje de hemoglobina A1c glicada en la muestra de sangre. Ejemplos de sustancias formadoras de color son la sal de sodio de N-carboximetilaminocarbonil)-4,4'-bis(dimetilamino)-difenilamina (DA-64), la sal hexasódica de N,N,N',N',N",N"-Hexa(3-sulfopropil)-4,4',4"-triamino-trifenilmetano (TPM-PS) o la sal de sodio de 10-(carboximetilaminocarbonil)-3,7-bis(dimetilamino)-fenotiazina (DA-67). Un ejemplo de peroxidasa es una peroxidasa de rábano.

En algunas realizaciones, el péptido glicado y/o el aminoácido glicado se ponen en contacto con la fructosil aminoácido oxidasa y la peroxidasa secuencialmente o simultáneamente. En algunas realizaciones, la FAOD, la peroxidasa y la sustancia formadora de color están formulados en una única composición. En algunas realizaciones, la FAOD, la peroxidasa y la sustancia formadora de color están formulados en una composición diferente y se añaden a la reacción al mismo tiempo o en momentos diferentes.

El porcentaje de hemoglobina glicada total o el porcentaje de hemoglobina A1c glicada en la muestra de sangre se determina comparando la absorbancia (p. ej., absorbancia a aproximadamente 700 nm) con una curva de calibración. Usando los presentes procedimientos, el porcentaje de hemoglobina glicada total o el porcentaje de hemoglobina A1c glicada en la muestra de sangre se determina sin medir la hemoglobina total en la muestra por separado. La curva de calibración se establece usando un calibrador, es decir muestras (incluidas muestras de sangre y calibradores artificiales) con un porcentaje conocido de hemoglobina glicada o un porcentaje conocido de hemoglobina A1c glicada. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 1.

En algunas realizaciones, la curva de calibración se prepara determinando los niveles de señal (p. ej., la absorbancia a aproximadamente 700 nm) para las muestras de calibración realizando las mismas etapas que las muestras desconocidas sin medir la hemoglobina total por separado; y realizando un gráfico de la correlación entre los niveles de la señal de las muestras de calibración y el porcentaje conocido de hemoglobina glicada o el porcentaje conocido de hemoglobina A1c glicada de las muestras de calibración. Por ejemplo, las muestras de sangre entera que tienen porcentajes del valor de la hemoglobina A1c glicada asignado por comparación a un material de referencia de mayor orden adecuado se pueden usar como calibradores. Como alternativa, el porcentaje de hemoglobina A1c glicada se puede determinar mediante otro procedimiento reconocido tal como HPLC. Los calibradores se prueban del mismo modo que las muestras desconocidas usando los procedimientos descritos en el presente documento. Los valores de absorbancia medidos para los calibradores se representan frente al valor de HbA1c previsto para establecer la curva de calibración.

Para establecer una curva de calibración también se pueden usar calibradores aparte de la muestra de sangre entera. Como calibradores artificiales se pueden usar muestras de hemolizado (muestras de sangre lisada), péptidos glicosados, aminoácidos glicosados y derivados de aminoácidos glicosados en una solución de matriz proteica tamponada adecuada que tiene un porcentaje del valor de la hemoglobina A1c glicada asignado por comparación con un material de referencia de orden mayor adecuado. Por ejemplo, las muestras de calibración se pueden preparar en una solución tamponada con fosfato con 10 % de BSA y cantidades adecuadas de fructosil propilamina (aminoácido glicado) sintetizada correspondiente a varios porcentajes de HbA1c (p. ej., de 5 % o 12 %). Los calibradores artificiales se analizan del mismo modo que las muestras desconocidas excepto que la etapa de lisado se puede no usar. Los valores de absorbancia medidos para estos calibradores se representan frente al valor de HbA1c previsto para establecer la curva de calibración. Los calibradores artificiales se pueden liofilizar o estabilizar durante una vida de conservación extendida.

Los presentes procedimientos se pueden usar con cualquier fin adecuado. Preferentemente, el procedimiento usado en el pronóstico o diagnóstico de una enfermedad o trastorno, por ejemplo diabetes.

C. Kits para analizar el porcentaje de hemoglobina glicada

La invención también proporciona un kit para analizar el porcentaje de hemoglobina glicada total o el porcentaje de hemoglobina glicada A1c sin medir la hemoglobina total por separado en una muestra de sangre, comprendiendo dicho kit: a) un tampón de lisis que lisa las células sanguíneas para liberar hemoglobina; b) un primer agente oxidante que oxida de forma selectiva las sustancias reductoras de bajo peso molecular, donde el primer agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en peryodinano de Dess-Martin, N-etilmaleimida, yodoacetato sódico, peryodato sódico y cloramina-T; c) un segundo agente oxidante que oxida de forma selectiva las sustancias reductoras de alto peso molecular; d) una proteasa que hidroliza la hemoglobina en fragmentos proteicos que contienen péptidos glicosados o aminoácidos glicosados; e) una fructosil aminoácido oxidasa que reacciona con péptidos glicosados y aminoácidos glicosados para generar peróxido de hidrógeno (H₂O₂); f) una peroxidasa y una sustancia formadora de color; y g) calibradores de hemoglobina glicada o hemoglobina glicada A1c (es decir, calibrador(es) con un porcentaje conocido de hemoglobina glicada o un porcentaje conocido de hemoglobina A1c glicada) para usar en la construcción de una curva de calibración, donde el primer agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en peryodinano de Dess-Martin, N-etilmaleimida, yodoacetato sódico, peryodato sódico y cloramina T y el segundo agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en una sal de tetrazolio, dodecilsulfato sódico, ferricianuro potásico (III) y yodato potásico.

En algunas realizaciones, el primer agente oxidante es peryodinano de Dess-Martin y/o N-etilmaleimida. En algunas realizaciones, el segundo agente comprende una sal de tetrazolio.

5 En algunas realizaciones, el tampón de lisis contiene el primer agente oxidante y/o el segundo agente oxidante. En algunas realizaciones, el tampón de lisis contiene la proteasa. En algunas realizaciones, el tampón de lisis contiene el primer agente oxidante, el segundo agente oxidante y la proteasa. En algunas realizaciones, el primer agente oxidante y el segundo agente oxidante están formulados en una única composición. En algunas realizaciones, el primer agente oxidante y el segundo agente oxidante están formulados en una composición separada. En algunas realizaciones, la proteasa está formulada en una única composición con el primer agente oxidante y/o el segundo agente oxidante.

10 La invención también proporciona un kit para analizar directamente el porcentaje de hemoglobina glicada total o el porcentaje de hemoglobina glicada A1c en una muestra de sangre sin la necesidad de una medición aparte del contenido de hemoglobina total en muestras de sangre, comprendiendo dicho kit: a) un tampón de lisis que lisa las células sanguíneas para liberar hemoglobina; b) un primero y segundo agente oxidante; c) una proteasa que hidroliza la hemoglobina en fragmentos proteicos que contienen péptidos glicosados o aminoácidos glicosados; d) una fructosil aminoácido oxidasa que reacciona con los péptidos glicosados y los aminoácidos glicosados para generar peróxido de hidrógeno (H₂O₂), donde la fructosil aminoácido oxidasa comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 1 o es un fragmento o un derivado funcional de una fructosil aminoácido oxidasa que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 1, donde el fragmento o derivado funcional conserva al menos el 90 % de la actividad de la fructosil aminoácido oxidasa que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 1, e) una peroxidasa y una sustancia formadora de color; y f) calibrador(es) con un porcentaje conocido de hemoglobina glicada o un porcentaje conocido de hemoglobina A1c glicada para usar en la construcción de una curva de calibración donde el primer agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en peryodinano de Dess-Martin, N-etilmaleimida, yodoacetato sódico, peryodato sódico y cloramina T, y el segundo agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en una sal de tetrazolio, dodecilsulfato sódico, ferricianuro potásico (III) y yodato potásico. En algunas realizaciones, el agente oxidante está contenido en el tampón de lisis. En algunas realizaciones, la proteasa está contenida en el tampón de lisis. En algunas realizaciones, el agente oxidante y la proteasa están contenidos en el tampón de lisis. En algunas realizaciones, la proteasa y el agente oxidante están formulados en una única composición.

25 En algunas realizaciones, la fructosil aminoácido oxidasa y la peroxidada están formulados en una única composición. En algunas realizaciones, el calibrador es una muestra de sangre con un porcentaje conocido de hemoglobina A1c glicada, que puede estar en forma liofilizada o en solución.

35 En algunas realizaciones, el kit comprende un tampón de lisis, un reactivo R1a, un reactivo R1b y un reactivo R2. En algunas realizaciones, el tampón de lisis contiene un primer agente oxidante (p. ej., N-etilmaleimida y/o peryodinano de Dess-Martin). En algunas realizaciones, el reactivo R1a comprende una proteasa y un primer agente oxidante (p. ej., N-etilmaleimida y/o peryodinano de Dess-Martin). En algunas realizaciones, el reactivo R1b comprende un primer agente oxidante (p. ej., N-etilmaleimida y/o peryodinano de Dess-Martin) y un segundo agente oxidante (p. ej., una sal de tetrazolio). En algunas realizaciones, el reactivo R2 comprende una fructosil aminoácido oxidasa, una peroxidasa (p. ej., peroxidasa de rábano) y una sustancia formadora de color (p. ej., DA-64). Por ejemplo, el tampón de lisis puede contener 0,1-10 % de Triton X-100 (p.ej., aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,2 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 7,5 %, aproximadamente 10 %); CHES 5 - 100 mM (p. ej., aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 100 mM), pH de aproximadamente 8,7; N-etilmaleimida 0,1 - 50 mM (p. ej., aproximadamente 0,1 mM, aproximadamente 0,5 mM, aproximadamente 1 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 50 mM); 0,1 - 5 % de SDS (p. ej., aproximadamente 0,15 %, aproximadamente 0,25 %, aproximadamente 0,35 %, aproximadamente 0,45 %, aproximadamente 0,55 %, aproximadamente 0,75 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 5 %); 0,001 - 1 KU/ml de catalasa p. ej., aproximadamente 1 U/ml, aproximadamente 2 U/ml, aproximadamente 3 U/ml, aproximadamente 4 U/ml, aproximadamente 5 U/ml, aproximadamente 10 U/ml, aproximadamente 50 U/ml, aproximadamente 100 U/ml, aproximadamente 500 U/ml, aproximadamente 1 KU/ml); 0,001 - 1 KU/ml de ascorbato oxidasa (p. ej., aproximadamente 1 U/ml, aproximadamente 2 U/ml, aproximadamente 4 U/ml, aproximadamente 5 U/ml, aproximadamente 10 U/ml, aproximadamente 50 U/ml, aproximadamente 100 U/ml, aproximadamente 1 KU/ml). El reactivo R1a puede contener 0,1 - 10 KU/ml de la proteasa de especies de Bacillus (p.ej., aproximadamente 0,1 KU/ml, aproximadamente 2 KU/ml, aproximadamente 3,0 KU/ml, aproximadamente 3,5 KU/ml, aproximadamente 4,0 KU/ml, aproximadamente 4,5 KU/ml, aproximadamente 5 KU/ml, aproximadamente 10 KU/ml); MES 1 - 100 mM (p.ej., aproximadamente 1 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 100 mM), pH de aproximadamente 7,0; CaCl₂ 1 - 10 mM (p.ej., aproximadamente 1 mM, aproximadamente 2,5 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 7,5 mM, aproximadamente 10 mM); peryodinano de Dess-Martin 0,01 - 10 mM (p.ej., aproximadamente 0,01 mM, aproximadamente 0,015 mM, aproximadamente 0,02 mM, aproximadamente 0,05 mM, aproximadamente 0,1 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM); 0,01 - 5 mg/ml de sal de sodio de 4-hidroxibenzoato de metilo (p. ej., aproximadamente 0,01 mg/ml, aproximadamente 0,05

mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml); y 0,001 - 1 mg/ml de geneticina (G418) (p. ej., aproximadamente 0,001 mg/ml, aproximadamente 0,01 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml). El reactivo R1b puede contener hidrato de MES 0,1 - 50 mM (p. ej., aproximadamente 0,1 mM, aproximadamente 0,5 mM, aproximadamente 1,0 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 50 mM); WST-3 0,1 - 50 mM (2-(4-yodofenil)3-(2,4-dinitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio, sal monosódica) (p. ej., aproximadamente 0,1 mM, aproximadamente 0,5 mM, aproximadamente 1 mM, aproximadamente 2,5 mM, aproximadamente 2,6 mM, aproximadamente 2,7 mM, aproximadamente 2,8 mM, aproximadamente 2,9 mM, aproximadamente 3,0 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 50 mM); y peryodinano de Dess Martin 0,01 - 10 mM (p. ej., aproximadamente 0,01 mM, aproximadamente 0,04 mM, aproximadamente 0,05 mM, aproximadamente 0,06 mM, aproximadamente 0,07 mM, aproximadamente 0,08 mM, aproximadamente 0,09 mM, aproximadamente 0,1 mM, aproximadamente 1 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM). El reactivo R2 puede contener 0,01 - 10 KU/ml de fructosil valina oxidasa (p. ej., aproximadamente 0,01 KU/ml, aproximadamente 0,012 KU/ml, aproximadamente 0,013 KU/ml, aproximadamente 0,0135 KU/ml, aproximadamente 0,014 KU/ml, aproximadamente 0,0145 KU/ml, aproximadamente 0,015 KU/ml, aproximadamente 0,0155 KU/ml, aproximadamente 0,016 KU/ml, aproximadamente 0,05 KU/ml, aproximadamente 0,1 KU/ml, aproximadamente 1 KU/ml, aproximadamente 5 KU/ml, aproximadamente 10 KU/ml); Tris-HCl 1 - 50 mM (p. ej., aproximadamente 1 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 50 mM), pH de aproximadamente 8,0; 0,1 - 10 % de Triton X-1 00 (p. ej., aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,2 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 7,5 %, aproximadamente 10 %); 0,01 - 10 KU/ml de peroxidasa de rábano (HRP) (p. ej., aproximadamente 0,01 KU/ml, aproximadamente 0,05 KU/ml, aproximadamente 0,08 KU/ml, aproximadamente 0,09 KU/ml, aproximadamente 0,1 KU/ml, aproximadamente 1,0 KU/ml, aproximadamente 5 KU/ml, aproximadamente 10 KU/ml); DA-64 0,01 - 10 mM (p. ej., aproximadamente 0,01 mM, aproximadamente 0,05 mM, aproximadamente 0,075 mM, aproximadamente 0,08 mM, aproximadamente 0,085 mM, aproximadamente 0,09 mM, aproximadamente 0,1 mM, aproximadamente 1 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM); y 0,01 - 10 mg/ml de geneticina (G418) (p. ej., aproximadamente 0,01 mg/ml, 0,05 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml). El kit puede comprender además instrucciones para poner en práctica los procedimientos descritos en el presente documento. El kit se puede usar como se describe con detalle en el Ejemplo 1.

Los kits de la invención pueden estar en cualquier envasado adecuado. Envases adecuados incluye, entre otros, viales, frascos, botes, envases flexibles y similares. Los kits pueden comprender además instrucciones para poner en práctica cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

Ejemplos

Ejemplo 1: Ensayo enzimático de HbA1c de un solo canal

Este ensayo de HbA1c de un solo canal es un ensayo enzimático en el que las muestras se lisan y se hacen reaccionar con agentes para eliminar las sustancias de interferencia en la señal de bajo peso molecular y de alto peso molecular. Las muestras de sangre entera lisada se someten a una extensa digestión con proteasa con la proteasa de especies de Bacillus. Este procedimiento libera aminoácidos, incluida valina glicada, de las cadenas beta de la hemoglobina. Después, la valina glicada sirve como sustrato de una enzima fructosil valina oxidasa (FVO) recombinante específica producida en E. coli. La FVO recombinante puede escindir específicamente la valina en el extremo N y producir peróxido de hidrógeno en presencia de agentes selectivos. Esto, a su vez, se mide usando una reacción catalizada por peroxidasa de rábano (POD) y un cromógeno adecuado. La concentración de HbA1c se expresa directamente como un % de HbA1c mediante el uso de una curva de calibración adecuada.

I. Composiciones de reactivo.

Tampón de lisis: CHES 50 mM, pH 9,4, 2 % de Triton X-100, peryodinano de Dess-Martin 3 mM y N-etilmaleimida 2,5 mM.

Reactivo R1a: Tampón MES 25 mM pH 6,5, CaCl₂ , 5 Mm, 1.000 U/ml de proteasa neutra (Toyobo Co., Ltd.), N-etilmaleimida 2 mM.

Reactivo R1b: MES 25 mM, pH 6,5, cloruro sódico 150 mM, peryodinano de Dess-Martin 5 mM, WST3 (2-(4-yodofenil)-3-(2,4-dinitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio, sal monosódica 2 mM (fabricada por Dojindo Laboratories)).

Reactivo R2: Tris 25 mM, pH 8,2, 5 U/ml de fructosil aminoácido oxidasa que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 1, 50 U/ml de peroxidasa de rábano y cromógeno 0,5 mM (N-(carboximetilaminocarbonil)-4, 4'bis(dimetilamino) difenilamina, sal de sodio (nombre del producto DA-64, fabricado por Wako).

II. Procedimiento de ensayo

5 Se dispensó tampón de lisis (500 µl) en un contenedor adecuado, tal como una taza de muestras o un tubo de microfuga de eppendorf. Antes de analizar, las muestras de sangre entera se mezclaron mediante inversión suave para resuspender los eritrocitos sedimentados. La muestra de sangre entera completamente resuspendida (40 µl) se mezcló suavemente con el tampón de lisis usando un pipetor adecuado sin crear espuma. Después, la mezcla se incubó durante de 5 minutos a 10 minutos a temperatura ambiente. Se observó lisis completa cuando la mezcla se convirtió en una solución rojo claro sin ninguna materia particulada.

10 Los reactivos R1 y R1b se mezclaron en una proporción en volumen de 70:30 antes de usar. El reactivo R1b se vertió en R1a y los reactivos se mezclaron suavemente mediante inversión para formar el reactivo R1ab.

15 El reactivo R1ab (170 µl) y el lisado (20 µl) se añadieron en una cubeta y se mezclaron. La cubeta se incubó a 37°C durante 5 minutos. La reacción también se puede llevar a cabo a temperatura ambiente. Tras la incubación, en la cubeta se añadieron 50 µl de reactivo R2. La absorbancia a 700 nm se monitorizó durante 2 minutos. El valor de la absorbancia se calculó para calibradores, controles y muestras restando el valor de la DO a A2 (absorbancia a 3 minutos tras la adición de R2) del valor de la DO a A1 (absorbancia justo después de la adición de R2), es decir $\Delta A700 = (A2-A1)$. Los límites de tiempo de la reacción se muestran en la Figura 1. Los valores de las muestras desconocidas se determinaron mediante el uso de una curva de calibración mostrada, por ejemplo, en la Figura 2 que se representó directamente en unidades % de HbA1c.

25 La curva de calibración (Figura 2) se preparó usando datos de la medición de la $\Delta A700$ para tres muestras estándar con un porcentaje conocido de hemoglobina A1c glicada (6,25 %, 10,00 % y 15,00 %) siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Los calibradores se prepararon analizando el material de sangre entera adecuada para los valores de HbA1c usando el procedimiento de HPLC. El material de sangre entera usada para calibrar se podía liofilizar o estabilizar durante una vida de conservación extendida.

30 Como se muestra en la Tabla 2, el valor del porcentaje de la hemoglobina A1c glicada obtenida usando el procedimiento descrito anteriormente (columna debajo de "valor obtenido") se correlaciona con el valor previsto en la muestra. El valor previsto para una muestra se obtuvo de la HPLC. Los intervalos para el valor previsto indican los intervalos de valores aceptables.

Tabla 2

Muestras	HbA1c (%)	
	Valor previsto (HPLC)	Valor obtenido
1	6,2 (5,27 - 7,13)	6,84
2	12,2 (10,37 - 14,03)	12,13
3	5,9 (5,0 - 6,8)	5,15
4	11,1 (9,4 - 12,7)	11,18
5	5,4	5,21
6	9,1	9,3
7	5,4	5,71
8	9,0	9,17

35 III. Precisión del ensayo enzimático de hemoglobina A1c de un solo canal

40 La precisión entre ciclos se evaluó con dos niveles de % de HbA1c diferentes de muestras de sangre entera fresca (ID de la muestra 10810285 HbA1c baja e ID de la muestra 10810244 HbA1c alta) duplicada 16 veces. La evaluación se realizó usando el instrumento autoanalizador Hitachi 917 y el ensayo enzimático de hemoglobina A1c de un solo canal descrito en este ejemplo. En el estudio se incluyeron un control normal y controles patonormales.

45 Las muestras de sangre entera con valores de % de HbA1c usadas para este estudio se obtuvieron de una fuente comercial certificada, ProMedDx, LLC (10 Commerce Way, Norton, MA 02766) y llegaron con un certificado del CRI de que los protocolos, el consentimiento informado usados para recoger muestras habían sido aprobados por el CRI.

La tabla 3 siguiente muestra la precisión del ensayo enzimático de hemoglobina A1c de un solo canal.

Tabla 3

	ID 10810285 (% HbA1c)	ID 10810244 (% HbA1c)
Valor medio	4,80%	8,20%
SD intraciclos	0,07	0,05
% CV intraciclos	1,40%	0,60%

IV. Exactitud del ensayo enzimático de hemoglobina A1c de un solo canal

5 Para demostrar la exactitud, el ensayo enzimático de hemoglobina A1c de un solo canal se usó con muestras de sangre entera individuales (serie ID representada más adelante) y se comparó con el ensayo de HPLC de HbA1c de Tosoh, que es el dispositivo de HbA1c comercializado actualmente (Tosoh 87: Modo de análisis de variantes de HbA1c). Los ensayos del estudio de exactitud se realizaron en el instrumento autoanalizador Hitachi 917.

10 Las muestras de sangre entera con valores de HbA1c verificados usados para este estudio se obtuvieron de una fuente comercial certificada, ProMedDx, LLC y llegaron con un certificado del CRI de que los protocolos, el consentimiento informado usados para recoger muestras habían sido aprobados por el CRI.

15 El estudio de comparación incluyó 30 muestras de ensayo y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4 más adelante. % de HbA1c de Tosoh" indica valores obtenidos usando el procedimiento HPLC de HbA1c de Tosoh para las muestras. "DZ % de HbA1c" indica los correspondientes valores obtenidos usando el ensayo de hemoglobina A1c de un solo canal descrito en este ejemplo.

Tabla 4

	ID de la muestra de sangre entera fresca	HbA1c (%) de Tosoh	DZ %HbA1c
1	10810257	4,9	5,1
2	10897226	5,1	5,4
3	10897227	5,1	5,1
4	10897229	5,2	5,4
5	10897230	5,3	5,2
6	10845039	8,7	8,4
7	10845043	8,5	8,7
8	10845044	7,1	6,8
9	10845045	7,8	7,5
10	10845059	6,9	6,8
11	10810281	10,9	11,7
12	10897261	9,6	10
13	10897272	10,1	10,9
14	10897278	14,4	15,6
15	10897231	5,6	5,6
16	10897234	5,7	5,8
17	10897238	5,4	5,4
18	10897239	5,7	5,9
19	10897241	5,4	5,3
20	10845060	7,6	7,4
21	10845063	8,1	7,3
22	10845065	6,4	6,4
23	10845066	6,5	6,6
24	10845068	6,7	6,3
25	10897285	10,8	9,7
26	10897286	9,9	10,4
27	10897290	9,7	8,7
28	10897295	9,6	9,8
29	DZ Ctl L1 Lote CON 100405B-1	5,3	5,4
30	DZ Ctl L2 Lote CON200405B-1	10,9	10,9

20 La figura 3 muestra el valor (%) de la HbA1c obtenido usando el ensayo enzimático de hemoglobina A1c de un canal descrito en este Ejemplo 1 representados de nuevo los resultados obtenidos con procedimientos de HPLC de Tosoh. Como se muestra en la Figura 3, la pendiente fue de 1,05; el coeficiente de correlación entre los dos procedimientos fue de 0,96; y la intersección y fue de -0,367.

Ejemplo 2: Ensayo enzimático de HbA1c de un solo canal usando un agente oxidante

Los procedimientos del ensayo de HbA1c de un solo canal en este ejemplo eran similares a los procedimientos descritos en el Ejemplo 1, excepto que se usó solo un agente oxidante para oxidar sustancias reductoras en las muestras de sangre.

I. Composiciones de reactivo

Tampón de lisis: CHES 50 mM pH 9,4 y 2 % de Triton X-100.

Reactivo R1a: Tampón MES 25 mM pH 6,5, CaCl₂ 5 mM, 1.000 U/ml de proteasa neutra (Toyobo Co., Ltd.).

Reactivo R1b: MES 25 mM, pH 6,5, cloruro sódico 150 mM y WST3 (2-(4-yodofenil)-3-(2,4-dinitrofenil)-5-(2,4-disulfenil)-2H-tetrazolio, sal monosódica 2 mM (fabricada por Dojindo Laboratories)).

Reactivo R2: Tris 25 mM, pH 8,2, 5 U/ml de fructosil aminoácido oxidasa que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 1, 50 U/ml de peroxidasa de rábano y cromágeno 0,5 mM (N-(carboximetilaminocarbonil)-4, 4'bis(dimetilamino) difenilamina, sal de sodio (nombre del producto DA-64, fabricado por Wako).

II. Procedimiento de ensayo

Se dispensó tampón de lisis (500 µl) en un contenedor adecuado, tal como una taza de muestras o un tubo de microfuga de eppendorf. Antes de analizar, las muestras de sangre entera se mezclaron mediante inversión suave para resuspender los eritrocitos sedimentados. La muestra de sangre entera completamente resuspendida (40 µl) se mezcló suavemente con el tampón de lisis usando un pipetor adecuado sin crear espuma. Después, la mezcla se incubó durante de 5 minutos a 10 minutos a temperatura ambiente. Se observó lisis completa cuando la mezcla se convirtió en una solución rojo claro sin ninguna materia particulada.

Los reactivos R1 y R1b se mezclaron en una proporción en volumen de 70:30 antes de usar. El reactivo R1b se vertió en R1a y los reactivos se mezclaron suavemente mediante inversión para formar el reactivo R1ab.

El reactivo R1ab (170 µl) y el lisado (20 µl) se añadieron en una cubeta y se mezclaron. La cubeta se incubó a 37°C durante 5 minutos. Tras la incubación, en la cubeta se añadieron 50 µl de reactivo R2. La absorbancia a 700 nm se monitorizó durante 2 minutos. El valor de la absorbancia se calculó para calibradores, controles y muestras restando el valor de la DO a A2 (absorbancia a 3 minutos tras la adición de R2) del valor de la DO a A1 (absorbancia justo después de la adición de R2), es decir $\Delta A_{700} = (A_2 - A_1)$. El límite de tiempo de la reacción se muestra en la Figura 1.

La Figura 4 muestra los datos de medir la ΔA_{700} (eje Y) para las muestras siguiendo el procedimiento descrito con anterioridad representados contra el porcentaje conocido de hemoglobina A1c glicada. La Figura 4 indica que el porcentaje de hemoglobina A1c glicada también se puede determinar directamente sin una medición separada de la hemoglobina total usando un sistema de reactivo con un único agente oxidante de tetrazolio, aunque los resultados (exactitud y correlación) no fueron tan buenos como los obtenidos con un sistema de reactivos con dos agentes oxidantes como se describe en el Ejemplo 1.

Aunque la invención anterior se ha descrito con algún detalle a modo de ilustraciones y ejemplos para los fines de claridad y comprensión, para los expertos en la técnica será obvio que pueden practicarse ciertos cambios y modificaciones. Por tanto, no deben interpretarse las descripciones y los ejemplos como limitantes del alcance de la invención, que se delimita mediante las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para analizar directamente el porcentaje de hemoglobina glicada total o el porcentaje de hemoglobina glicada A1c en una muestra de sangre sin medir la hemoglobina total en la muestra de sangre en un procedimiento aparte, comprendiendo dicho procedimiento:
- 5
- a) poner en contacto fragmentos proteicos que contienen péptidos glicosados o aminoácidos glicosados con una fructosil aminoácido oxidasa para generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2), donde los fragmentos proteicos se generan poniendo en contacto la muestra de sangre con 1) un tampón de lisis que libera hemoglobina de los glóbulos rojos en la muestra de sangre; 2) un primer agente oxidante que oxida de forma selectiva las sustancias reductoras de bajo peso molecular; 3) un segundo agente oxidante que oxida de forma selectiva las sustancias reductoras de alto peso molecular y 4) una proteasa que digiere la hemoglobina glicada en péptidos glicosados o aminoácidos glicosados, donde el primer agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en peryodinano de Dess-Martin, N-etilmaleimida, yodoacetato sódico, peryodato sódico y cloramina-T, y el segundo agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en una sal de tetrazolio, dodecilsulfato sódico, ferricianuro potásico (III) y yodato potásico, b) poner en contacto el H_2O_2 generado en la etapa a) con una sustancia formadora de color en presencia de una peroxidasa para generar una señal cuantificable; y c) determinar el porcentaje de hemoglobina glicada total o el porcentaje de hemoglobina glicada A1c en la muestra aplicando la señal generada en la etapa b) a una curva de calibración sin medir la hemoglobina total en la muestra de sangre por separado.
- 10
- 15
- 20
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el primer agente oxidante es peryodinano de Dess-Martin y/o N-etilmaleimida y donde el segundo agente oxidante es una sal de tetrazolio.
- 25
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, donde el tampón de lisis contiene al menos uno de los siguientes:
- a) un primer agente oxidante
b) un segundo agente oxidante
c) una proteasa o
d) una combinación de cualquiera de a), b) y c).
- 30
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el primer agente oxidante y el segundo agente oxidante están formulados en una única composición o una composición separada.
- 35
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la proteasa está formulada en una única composición con a) el primer agente oxidante o b) el segundo agente oxidante o c) el primer agente oxidante y el segundo agente oxidante.
- 40
6. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la fructosil aminoácido oxidasa, la peroxidada y la sustancia formadora de color están formulados en una única composición.
- 45
7. El procedimiento de la reivindicación 2, donde la sal de tetrazolio es sal monosódica de 2-(4-yodofenil)-3-(2,4-dinitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio o sal monosódica de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio.
- 50
8. El procedimiento de la reivindicación 1, donde la sustancia formadora de color es la sal de sodio de N-Carboximetilaminocarbonil)-4,4'-bis(dimetilamino)-difetilamina (DA-64), la sal hexasódica de N,N,N',N'',N'''-Hexa(3-sulfopropil)-4,4',4'',-triamino-trifenilmetano (TPM-PS) o la sal de sodio de 10-(carboximetilaminocarbonil)-3,7-bis(dimetilamino)-fenotiazina (DA-67).
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la fructosil aminoácido oxidasa comprende la secuencia de aminoácidos indicada en

(SEC ID N° 1)

(MGGSGDDDDLALAVTKSSLLIVGAGTWGTSTALHLARRGYTNVTVLDPYPVPSAISA
 GNDVNKVISSGQYSNNKDEIEVNEILAEAFNGWKNDPLFKPYYHDTGLLMSACSQEGL
 DRLGVRVRPGEDPNLVELTRPEQFRKLAPEGVLQGDFFPGWKGYFARSGAGWAHARNA
 LVAAAREAQRMGVKFVTGTPQGRVVTLIFENND VKGAVTGDGKIWRRAERTFLCAGASA

GQFLDFKNQLRPTA WTLVHIALKPEERAL YKNIPVIFNIERGGFFEPDEERGEIKICDEHPG
 YTNMVQSADGTMMSIPFEKTQIPKEAETRVRALLKETMPQLADRPFSFARJWCADTAN
 REFLIDRHPQYHSLVLGCGASGRGFKYLPISIGNLIVD AMEGKVPQKIHელიკWNPDIAAN
 RNWRDTLGRFGGPNRVMDFHVDVKEWTNVQYRDISKLGEGLEGLPIPPLLRTGHHHHH
 H).

10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que se usa en el pronóstico o diagnóstico de una enfermedad o trastorno.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, donde la enfermedad o trastorno es diabetes.

12. Un kit para analizar directamente el porcentaje de hemoglobina glicada total o el porcentaje de hemoglobina glicada A1c en una muestra de sangre sin la necesidad de una medición aparte del contenido de hemoglobina total en muestras de sangre, comprendiendo dicho kit:

- a) un tampón de lisis que lisa las células sanguíneas para liberar hemoglobina;
- b) un primer agente oxidante que oxida de forma selectiva las sustancias reductoras de bajo peso molecular; donde el primer agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en peryodinato de Dess-Martin, N-etilmaleimida, yodoacetato sódico, peryodato sódico y cloramina T.
- c) un segundo agente oxidante que oxida de forma selectiva las sustancias reductoras de alto peso molecular; donde el segundo agente oxidante se selecciona del grupo que consiste en una sal de tetrazolio, dodecilsulfato sódico, ferricianuro potásico (III) y yodato potásico.
- d) una proteasa que hidroliza hemoglobina en un fragmentos proteicos que contienen péptidos glicosados o aminoácidos glicosados;
- e) una fructosil aminoácido oxidasa que reacciona con péptidos glicosados y aminoácidos glicosados para generar peróxido de hidrógeno (H₂O₂);
- f) una peroxidasa y una sustancia formadora de color;
- g) calibrador(Es) con un porcentaje conocido de hemoglobina glicada o un porcentaje conocido de hemoglobina A1c glicada para usar en la construcción de una curva de calibración; y
- h) instrucciones para realizar el procedimiento de la reivindicación 1.

13. El kit de la reivindicación 12, donde el primer agente oxidante y el segundo agente oxidante están contenidos en el tampón de lisis.

14. El kit de la reivindicación 12 o 13, donde el primer agente oxidante y el segundo agente oxidante están contenidos en el mismo tampón de lisis con la proteasa.

15. El kit de las reivindicaciones 12 a 14, donde la fructosil aminoácido oxidasa, la peroxidasa y la sustancia formadora de color están formulados en una única composición.

16. Un procedimiento para analizar directamente el porcentaje de hemoglobina glicada total o el porcentaje de hemoglobina glicada A1c en una muestra de sangre sin medir la hemoglobina total en la muestra de sangre en un procedimiento aparte, comprendiendo dicho procedimiento:

- a) poner en contacto los fragmentos proteicos que contienen péptidos glicosados o aminoácidos glicosados con una fructosil aminoácido oxidasa para generar peróxido de hidrógeno (H₂O₂), donde los fragmentos proteicos se generan poniendo en contacto la muestra de sangre con 1) un tampón de lisis que libera hemoglobina de los glóbulos rojos en la muestra de sangre;
- a) un agente oxidante que es una sal de tetrazolio y 3) una proteasa que digiere la hemoglobina glicada en péptidos glicosados o aminoácidos glicosados; y donde la fructosil aminoácido oxidasa comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 1 o es un fragmento o un derivado funcional de una fructosil aminoácido oxidasa que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 1, donde el fragmento o derivado funcional conserva al menos el 90 % de la actividad de la fructosil aminoácido oxidasa que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC ID N° 1;
- b) poner en contacto el H₂O₂ generado en la etapa a) con una sustancia formadora de color en presencia de una peroxidasa para generar una señal cuantificable; y
- c) determinar el porcentaje de hemoglobina glicada total o el porcentaje de hemoglobina A1c glicada en la muestra aplicando la señal generada en la etapa b) a una curva de calibración sin medir la hemoglobina total en la muestra por separado.

17. El procedimiento de la reivindicación 16, donde el tampón de lisis contiene el agente oxidante.

18. El procedimiento de la reivindicación 16 o 17, donde el tampón de lisis contiene la proteasa.

19. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones 16 a 18, donde el agente oxidante y la proteasa están formulados en una única composición.

5

Figura 1

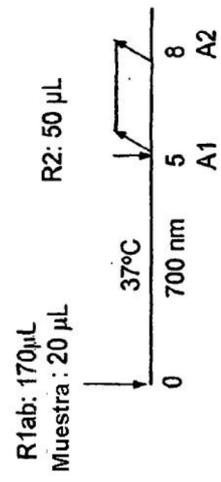


Figura 2

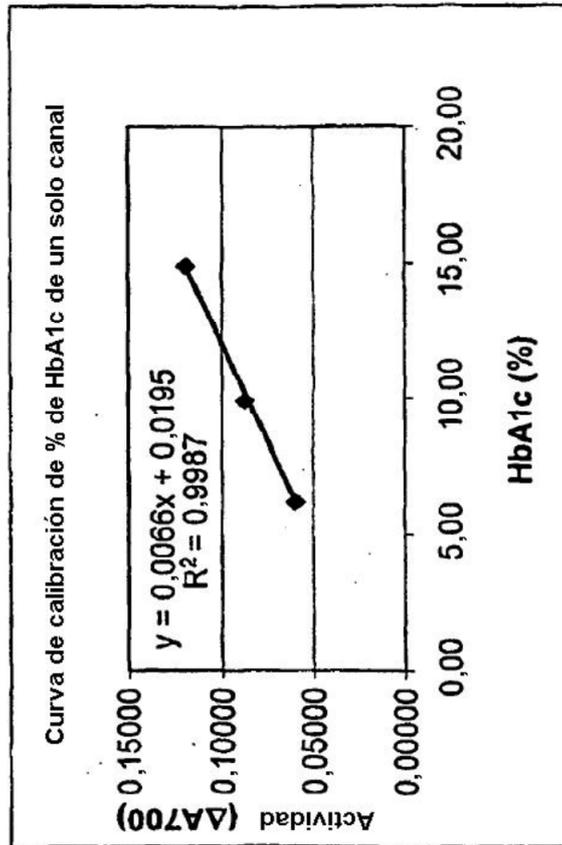


Figura 3

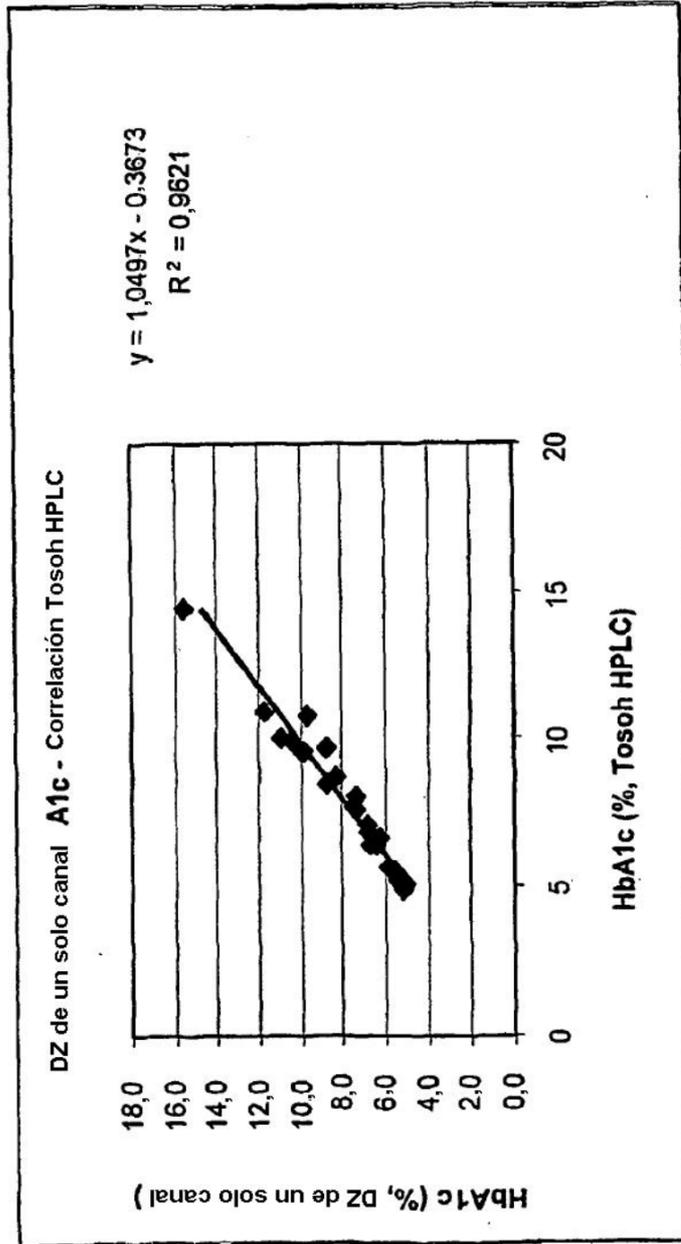


Figura 4

