

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 114**

51 Int. Cl.:

G01N 33/72 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2008 E 08851484 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 2210113**

54 Título: **Métodos para la detección de hemoglobina glicosilada**

30 Prioridad:

20.11.2007 US 989210 P

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

16.07.2015

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)
511 BENEDICT AVENUE
TARRYTOWN, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

**CHAPOTEAU, EDDY;
EDWARDS, RICHARD;
SWIRSKI, CHESTER y
ZAZULAK, WOLODYMYR**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 541 114 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).

MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE HEMOGLOBINA GLICOSILADA**DESCRIPCIÓN****5 Campo de la invención**

Aspectos particulares de la presente invención se refieren a métodos para detectar hemoglobina humana glicosilada en, por ejemplo, sangre completa humana, que no se ven afectados por la presencia de variantes de hemoglobina en la sangre.

10

Antecedentes de la invención

La hemoglobina presente en los glóbulos rojos puede glicosilarse mediante la adición no enzimática de una molécula de glucosa al extremo amino terminal de la cadena β de la hemoglobina. Una vez que se glicosila una molécula de hemoglobina, permanece glicosilada, y una acumulación de hemoglobina glicosilada dentro de un glóbulo rojo refleja el nivel promedio de glucosa al que la célula se ha expuesto durante su ciclo de vida. El nivel de hemoglobina glicosilada presente en la sangre de un individuo es por tanto proporcional al nivel de glucosa en la sangre, y es un indicador de la concentración de glucosa en sangre diaria media del individuo a lo largo de las cuatro semanas a los tres meses previos.

20

Existen numerosos métodos para determinar el nivel de hemoglobina glicosilada en sangre humana, la mayoría de los cuales implican calcular la cantidad relativa de hemoglobina glicosilada A (HbA1c) presente en la sangre, debido al hecho de que la hemoglobina A (HbA) es la forma principal de hemoglobina presente en la sangre humana. Técnicas tales como cromatografía de líquidos de alta resolución y selección por inmutofinidad se usan en tales métodos, que se aprovechan de las propiedades físicas y/o químicas de la hemoglobina glicosilada A que la distinguen de otras formas de hemoglobina presentes en la sangre.

25

En el artículo de H.W. Vesper *et al.*, Assessment of microwave assisted enzymatic digestion by measuring glycated hemoglobin A1c by mass spectrometry, en Rapid Commun. Mass Spectrom. 19 [2005] 2865 - 2870, se evalúa el uso de digestión enzimática asistida por microondas para el análisis cuantitativo de proteínas para la medición de hemoglobina glicosilada (HbA1c). Se usan tripsina y Glu-C como enzimas proteolíticas en la digestión enzimática asistida por microondas. Se detectan mediante espectrometría de masas hexapéptidos glicosilados y octapéptidos glicosilados obtenidos mediante la digestión enzimática.

30

En el artículo de P. Metus *et al.*, Immunoturbidimetric assay of glycated hemoglobin, en J. Clin. Lab. Analysis 13 [1999] 5 - 8, se da a conocer un ensayo inmunoturbidimétrico potenciado con látex de hemoglobina glicosilada HbA1c, usando anticuerpos monoclonales específicos contra los fragmentos β -N-terminales. La hemoglobina se degrada proteolíticamente, sin especificar el tipo de enzimas proteolíticas.

35

En el documento WO 2008/009445 A1 anterior pero no publicado previamente se da a conocer un reactivo para la digestión de hemoglobina HbA1c. Comprende un tampón, pepsina y una sal de 1,3-dialquilimidazolio. Se da a conocer además un método para medir HbA1c en el que se mezcla una muestra que contiene hemoglobina con el reactivo y la hemoglobina se digiere durante de 1 a 60 min. Entonces se mide un fragmento que comprende los 14 aminoácidos N-terminales de HbA1c obtenido en la etapa de digestión.

40

45

En el documento US 7 153 666 B2 se enseña un método para la determinación de proteínas glicosiladas. En el método, se pone en contacto una muestra que contiene una proteína glicosilada con una proteasa para generar un péptido glicosilado o un aminoácido glicosilado. El péptido glicosilado o aminoácido glicosilado se pone en contacto entonces con una proteína química que comprende un primer fragmento de peptidilo que comprende una secuencia líder bacteriana que tiene una longitud de aproximadamente 5 a 30 aminoácidos, y un segundo fragmento de peptidilo que comprende una amadoriasa, para oxidar el péptido glicosilado o aminoácido glicosilado.

50

Sin embargo, existen formas variantes de hemoglobina, tales como hemoglobina S (HbS) y hemoglobina C (HbC), que difieren de la hemoglobina A en el residuo de aminoácido en la posición seis de la cadena β de hemoglobina. Las formas de hemoglobina S y hemoglobina C de hemoglobina pueden glicosilarse, y se ha mostrado que la hemoglobina S y la hemoglobina C glicosiladas interfieren con la mayor parte de los métodos actuales para cuantificar hemoglobina humana glicosilada, provocando una elevación de hasta el 40% en los resultados. Existe por tanto una necesidad de métodos para detectar hemoglobina humana glicosilada que no se vean sometidos a interferencia provocada por variantes de hemoglobina.

55

60

Sumario de la invención

En determinadas realizaciones, la invención se refiere a métodos para detectar hemoglobina humana glicosilada que comprenden poner en contacto una muestra que va a someterse a prueba para detectar hemoglobina humana glicosilada con una endopeptidasa, poner en contacto la muestra tratada con endopeptidasa con endopeptidasa específica de prolina, y detectar el pentapéptido amino-terminal de la cadena β glicosilada de hemoglobina humana.

65

En otras realizaciones, la invención se refiere a métodos para detectar hemoglobina humana glicosilada que comprenden poner en contacto una muestra que va a someterse a prueba para detectar hemoglobina humana glicosilada con una endopeptidasa o bien simultáneamente con, antes de, o bien tras poner en contacto la muestra con un reactivo aglutinador, poner en contacto la muestra tratada con endopeptidasa y reactivo aglutinador con endopeptidasa específica de prolina, y detectar el pentapéptido amino-terminal de la cadena β glicosilada de hemoglobina humana con un inmunoensayo de inhibición de la aglutinación.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa la velocidad de aglutinación de látex recubierto con anticuerpo monoclonal de ratón anti-HbA1c provocada por diversas formulaciones de un reactivo aglutinador (sexapéptido glicosilado amino-terminal de la cadena β conjugado con poliaspartamida de hemoglobina humana) a lo largo de un periodo de 14 días. Las formulaciones contenían el reactivo aglutinador sin tanto ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) como endopeptidasa específica de prolina, con EDTA sólo, y tanto con EDTA como con endopeptidasa específica de prolina.

La figura 2 representa la velocidad de aglutinación de látex recubierto con anticuerpo monoclonal de ratón anti-HbA1c provocada por diversas formulaciones de un reactivo aglutinador (sexapéptido glicosilado amino-terminal de la cadena β conjugado con poliaspartamida de hemoglobina humana) a lo largo de un periodo de 18 días. Las formulaciones contenían el reactivo aglutinador y endopeptidasa específica de prolina tanto con EDTA como con BSA, o con BSA sólo.

La figura 3 representa una pendiente de correlación en la que el porcentaje de hemoglobina glicosilada presente en muestras de sangre completa humana que contienen hemoglobina S y hemoglobina C calculado usando el método de HbA1c ADVIA® 1650 se representa gráficamente frente al porcentaje de hemoglobina glicosilada presente en las muestras calculado usando en ensayo de HbA1c DCA® 2000.

La figura 4 representa una pendiente de correlación en la que el porcentaje de hemoglobina glicosilada que se determina que está presente en muestras de sangre completa humana que contienen hemoglobina S y hemoglobina C que se hicieron reaccionar con un reactivo aglutinador y endopeptidasa específica de prolina 0,0 U/ml usando un instrumento ADVIA® 1650 se representa gráficamente frente al porcentaje de hemoglobina glicosilada presente en las muestras determinadas usando el ensayo de HbA1c DCA® 2000.

La figura 5 representa una pendiente de correlación en la que el porcentaje de hemoglobina glicosilada que se determina que está presente en muestras de sangre completa humana que contienen hemoglobina S y hemoglobina C que se hicieron reaccionar con un reactivo aglutinador y endopeptidasa específica de prolina 0,1 U/ml usando un instrumento ADVIA® 1650 se representa gráficamente frente al porcentaje de hemoglobina glicosilada presente en las muestras determinadas usando el ensayo de HbA1c DCA® 2000.

La figura 6 representa una pendiente de correlación en la que el porcentaje de hemoglobina glicosilada que se determina que está presente en muestras de sangre completa humana que contienen hemoglobina S y hemoglobina C que se hicieron reaccionar con un reactivo aglutinador y endopeptidasa específica de prolina 0,2 U/ml usando un instrumento ADVIA® 1650 se representa gráficamente frente al porcentaje de hemoglobina glicosilada presente en las muestras determinadas usando el ensayo de HbA1c DCA® 2000.

La figura 7 representa una pendiente de correlación en la que el porcentaje de hemoglobina glicosilada que se determina que está presente en muestras de sangre completa humana que contienen hemoglobina S y hemoglobina C que se hicieron reaccionar con un reactivo aglutinador y endopeptidasa específica de prolina 0,33 U/ml usando un instrumento ADVIA® 1650 se representa gráficamente frente al porcentaje de hemoglobina glicosilada presente en las muestras determinadas usando el ensayo de HbA1c DCA® 2000.

La figura 8 representa una pendiente de correlación en la que el porcentaje de hemoglobina glicosilada que se determina que está presente en muestras de sangre completa humana que contienen hemoglobina S y hemoglobina C que se hicieron reaccionar con un reactivo aglutinador y endopeptidasa específica de prolina 0,43 U/ml usando un instrumento ADVIA® 1650 se representa gráficamente frente al porcentaje de hemoglobina glicosilada presente en las muestras determinadas usando el ensayo de HbA1c DCA® 2000.

La figura 9 representa una pendiente de correlación en la que el porcentaje de hemoglobina glicosilada que se determina que está presente en muestras de sangre completa humana que contienen hemoglobina S y hemoglobina C que se hicieron reaccionar con un reactivo aglutinador y endopeptidasa específica de prolina 0,54 U/ml usando un instrumento ADVIA® 1650 se representa gráficamente frente al porcentaje de hemoglobina glicosilada presente en las muestras determinadas usando el ensayo de HbA1c DCA® 2000.

La figura 10 representa valores de las pendientes de correlación ilustradas en las figuras 3 a 9 representados gráficamente frente a la concentración de endopeptidasa específica de prolina.

Descripción detallada de realizaciones ilustrativas

5 Aspectos particulares de la presente invención se refieren a métodos para detectar hemoglobina glicosilada presente en sangre humana que no se ven afectados por la variación en la secuencia de aminoácidos que puede existir en cadenas β de hemoglobina. Los métodos detectan toda la hemoglobina glicosilada en una muestra, independientemente de la forma de la hemoglobina que se ha glicosilado, y por tanto detectan hemoglobina A, hemoglobina S y hemoglobina C glicosiladas.

10 La hemoglobina S y la hemoglobina C contienen una mutación puntual en la posición 6 de la cadena β de hemoglobina humana. El residuo de ácido glutámico en la posición seis de la cadena β de hemoglobina A se reemplaza con un residuo de lisina en la hemoglobina C y con un residuo de valina en la hemoglobina S. Los 18 aminoácidos amino-terminales glicosilados de las cadenas β de hemoglobina humana A, hemoglobina S y hemoglobina C humanas se muestran a continuación:

15 HbA: Glucosa-Val-His-Leu-Thr-Pro-**Glu**-Glu-Lys-Ser-Ala-Val-Thr-Ala-Leu-Try-Gly-Lys-Val---

HbC: Glucosa-Val-His-Leu-Thr-Pro-**Lys**-Glu-Lys-Ser-Ala-Val-Thr-Ala-Leu-Try-Gly-Lys-Val---

20 HbS: Glucosa-Val-His-Leu-Thr-Pro-**Val**-Glu-Lys-Ser-Ala-Val-Thr-Ala-Leu-Try-Gly-Lys-Val---

25 La endopeptidasa específica de prolina (PSE) escinde selectivamente en el lado de carboxilo del residuo de prolina en la posición 5 de la cadena β de hemoglobina humana. La digestión de muestras que contienen hemoglobina A, hemoglobina S y hemoglobina C con endopeptidasa específica de prolina produce por tanto el mismo pentapéptido glicosilado para cada una de hemoglobina A, hemoglobina S y hemoglobina C.

30 Determinadas realizaciones de la presente invención se refieren a métodos que incluyen digerir muestras que contienen hemoglobina humana tratadas con endopeptidasa con endopeptidasa específica de prolina para liberar el pentapéptido amino-terminal glicosilado o no glicosilado de la cadena β de hemoglobina humana. El nivel de pentapéptido glicosilado en las muestras puede cuantificarse entonces para proporcionar una indicación de la cantidad de hemoglobina glicosilada presente en las muestras.

35 Tal como se usan en el presente documento, los términos “detectar”, “detección” y todas las variaciones de los mismos se refieren a cualquier método usado para determinar cuantitativamente la presencia de hemoglobina humana glicosilada o del pentapéptido amino-terminal de hemoglobina humana glicosilada presente en una muestra independientemente de la cantidad de la hemoglobina humana glicosilada o del pentapéptido amino-terminal de hemoglobina humana glicosilada presente en la muestra e independientemente de la forma de la hemoglobina presente en la muestra e independientemente de la forma de la hemoglobina en la muestra de la que se originó el péptido.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término “hemoglobina humana glicosilada” se refiere a cualquier forma de hemoglobina humana a la que se ha unido una molécula de glucosa al extremo amino terminal de la cadena β de la hemoglobina sin la acción de una enzima. El término “pentapéptido amino-terminal de la cadena β glicosilada de hemoglobina humana” se refiere al pentapéptido amino-terminal de la cadena β de cualquier forma de hemoglobina humana a la que se ha unido una molécula de glucosa al extremo amino-terminal del pentapéptido sin la acción de una enzima.

45 Tal como se usan en el presente documento, los términos “puesta en contacto”, “poner en contacto” y todas las variaciones de los mismos, se refieren a cualquier medio que provoca directa o indirectamente que se coloquen juntos restos o componentes, de manera que los restos o componentes entren en contacto físico entre sí. La puesta en contacto incluye por tanto actos físicos tales como colocar los restos o componentes juntos en un recipiente, combinar los restos o componentes, o mezclar los restos o componentes.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “endopeptidasa” se refiere a cualquier enzima que hidroliza un enlace peptídico en un péptido, polipéptido o proteína.

55 Tal como se usa en el presente documento, el término “endopeptidasa ácida” se refiere a cualquier enzima que hidroliza un enlace peptídico en un péptido, polipéptido o proteína en un entorno ácido.

60 Tal como se usan en el presente documento, los términos “mezclado”, “mezclar”, “adición” y “añadir”, y todas las variaciones de los mismos, se refieren a cualquier medio que provoca directa o indirectamente que se coloquen juntos restos o componentes, de manera que los restos o componentes entren en proximidad estrecha entre sí. Los términos incluyen actos tales como colocar los restos o componentes juntos en un recipiente, combinar los restos o componentes, poner en contacto los restos o componentes, o agitar, agitar con vórtex o remover los restos o componentes juntos. El término “mezcla” se refiere a restos o componentes que se han colocado juntos en

65

proximidad estrecha.

Aspectos particulares de la invención se refieren a métodos para detectar hemoglobina humana glicosilada que comprenden poner en contacto una muestra que va a someterse a prueba para detectar hemoglobina humana glicosilada con una endopeptidasa, poner en contacto la muestra tratada con endopeptidasa con endopeptidasa específica de prolina, y detectar el pentapéptido amino-terminal de la cadena β glicosilada de hemoglobina humana presente en la muestra.

En realizaciones preferidas de la invención, la muestra es sangre completa humana.

En determinadas realizaciones de la invención, se determina el porcentaje de hemoglobina humana glicosilada en la muestra. En tales métodos, se determina la concentración de hemoglobina humana glicosilada en la muestra y también se determina la concentración de hemoglobina total, que incluye tanto hemoglobina glicosilada como no glicosilada, en las muestras. El porcentaje de hemoglobina humana glicosilada en la muestra se calcula dividiendo la concentración de la hemoglobina glicosilada entre la concentración de la hemoglobina total.

La concentración de hemoglobina total en la muestra puede determinarse usando métodos familiares para los expertos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, un ensayo basado en la conversión de todos los derivados de hemoglobina en hematina alcalina tras el tratamiento con una disolución alcalina de un detergente no iónico, tal como se describe en Wolf, H.U., *et al.*, Clin Chim Acta, 1984, 136, 95-104 y Zander R., *et al.*, Clin Chim Acta, 1984, 136, 83-93, incorporados en el presente documento como referencia en su totalidad. La hematina alcalina tiene un espectro de absorción definido a 600 nm, y el contenido en hematina puede medirse determinando la absorción a 600 nm.

Puede usarse cualquier endopeptidasa para digerir inicialmente la hemoglobina humana presente en una muestra antes de la digestión con endopeptidasa específica de prolina. La digestión con endopeptidasa puede realizarse manualmente o puede realizarse automáticamente en cualquier sistema de química que pueda diluir la muestra.

En realizaciones particulares de la invención, la endopeptidasa es una endopeptidasa ácida. En realizaciones preferidas de la invención, la endopeptidasa ácida es pepsina, aspergillopepsina II, catepsina D, sacaropepsina, mucorpepsina, quimosina, gastricsina o fisiolisina. En realizaciones particularmente preferidas, la endopeptidasa ácida es pepsina. En determinados aspectos de la invención, las muestras se digieren con pepsina de aproximadamente 5 U/ml a aproximadamente 10.000 U/ml. En realizaciones preferidas, las muestras se digieren con pepsina de aproximadamente 4.800 U/ml a aproximadamente 8.600 U/ml. En realizaciones particularmente preferidas, las muestras se digieren con pepsina de aproximadamente 6.000 U/ml a aproximadamente 7.000 U/ml. En realizaciones particulares de la invención, la digestión con pepsina se realiza a un pH en el intervalo de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 5,0. En realizaciones preferidas de la invención, la digestión con pepsina se realiza a un pH en el intervalo de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 4,0. En realizaciones particularmente preferidas de la invención, la digestión con pepsina se realiza a un pH en el intervalo de aproximadamente 2,3 a aproximadamente 2,5.

En determinadas realizaciones de la invención, tras la digestión con endopeptidasa, las muestras se digieren con endopeptidasa específica de prolina. En realizaciones particulares, tales muestras se tratan con endopeptidasa específica de prolina de aproximadamente 0,1 U/ml a aproximadamente 30 U/ml. En realizaciones preferidas, tales muestras se tratan con endopeptidasa específica de prolina de aproximadamente 0,3 U/ml a aproximadamente 5,0 U/ml. En realizaciones particularmente preferidas, tales muestras se tratan con endopeptidasa específica de prolina de aproximadamente 0,5 U/ml a aproximadamente 0,8 U/ml. En realizaciones particulares de la invención, tales digestiones con endopeptidasa específica de prolina se realizan a un pH en el intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 9,0. En realizaciones preferidas de la invención, tales digestiones con endopeptidasa específica de prolina se realizan a un pH en el intervalo de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0. En realizaciones particularmente preferidas de la invención, tales digestiones con endopeptidasa específica de prolina se realizan a un pH en el intervalo de aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,1.

El pentapéptido amino-terminal de la cadena β glicosilada de hemoglobina humana liberado tras la digestión con endopeptidasa y endopeptidasa específica de prolina puede detectarse con cualquier método, incluyendo, por ejemplo, métodos que comprenden el uso de cromatografía de líquidos de alta resolución o que comprenden la unión de al menos un anticuerpo, ya sea policlonal o monoclonal, al pentapéptido glicosilado.

En realizaciones preferidas de la invención, el pentapéptido amino-terminal de la cadena β glicosilada de hemoglobina humana se detecta con un inmunoensayo de inhibición de la aglutinación, tal como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense número 4.847.209, incorporada en el presente documento como referencia en su totalidad. En ejemplos particulares de tales ensayos, se mezclan muestras que contienen el pentapéptido amino-terminal de la cadena β glicosilada de hemoglobina humana con un reactivo aglutinador, tal como, por ejemplo, sexapéptido de Val-His-Leu-Thr-Tyr-Cys glicosilado conjugado con poliaspartamida. También se mezclan muestras con un anticuerpo. En realizaciones preferidas de la invención, el anticuerpo se une específicamente tanto

al pentapéptido amino-terminal de la cadena β glicosilada de hemoglobina humana como al reactivo aglutinador. En aspectos particulares de la invención, se une al menos una molécula de anticuerpo a una o más partículas de látex. Los anticuerpos preferidos incluyen, por ejemplo, anticuerpo monoclonal de ratón anti-HbA1c recubierto sobre látex.

5 En tales inmunoensayos de inhibición de la aglutinación, el pentapéptido glicosilado amino-terminal de la cadena β de hemoglobina humana en una muestra compite con el reactivo aglutinador por sitios de unión del anticuerpo y
 10 ralentiza la velocidad de aglutinación, lo que se produce cuando el reactivo aglutinador se une al anticuerpo recubierto sobre látex. Cuanto más pentapéptido glicosilado amino-terminal de la cadena β de hemoglobina humana esté presente en la muestra, más lenta será la velocidad de aglutinación. La velocidad de aglutinación proporciona
 por tanto una indicación de la concentración de pentapéptido glicosilado amino-terminal de la cadena β de hemoglobina humana presente en la muestra.

La digestión con endopeptidasa, la digestión con endopeptidasa específica de prolina y el inmunoensayo de
 15 inhibición de la aglutinación pueden realizarse de diversos modos. Por ejemplo, en determinadas realizaciones de la invención, las muestras se digieren en primer lugar con una endopeptidasa y las muestras tratadas con endopeptidasa se hacen reaccionar entonces con endopeptidasa específica de prolina, seguido por la puesta en contacto de la muestra con un reactivo aglutinador, seguido por la puesta en contacto de las muestras con un anticuerpo. En otras realizaciones de la invención, las muestras se digieren en primer lugar con una endopeptidasa y las muestras tratadas con endopeptidasa se ponen en contacto entonces con una mezcla de endopeptidasa
 20 específica de prolina y un reactivo aglutinador, seguido por la puesta en contacto de las muestras con un anticuerpo. En realizaciones todavía adicionales de la invención, las muestras se digieren en primer lugar con una endopeptidasa y las muestras tratadas con endopeptidasa se ponen en contacto entonces con un reactivo aglutinador, seguido por la puesta en contacto de las muestras con endopeptidasa específica de prolina, seguido por la puesta en contacto de las muestras con un anticuerpo.

25 Aspectos particulares de la invención se refieren por tanto a métodos que comprenden poner en contacto muestras con una endopeptidasa y poner en contacto las muestras tratadas con endopeptidasa con endopeptidasa específica de prolina o bien simultáneamente con, antes de, o bien tras poner en contacto la muestra con un reactivo aglutinador.

30 En realizaciones preferidas de la invención, la muestra tratada con endopeptidasa se pone en contacto con una mezcla de endopeptidasa específica de prolina y el reactivo aglutinador. En ejemplos particulares de tales realizaciones, la mezcla de endopeptidasa específica de prolina y el reactivo aglutinador comprende de aproximadamente 0,1 g/dl a aproximadamente 5,0 g/dl de albúmina sérica bovina y de aproximadamente 0,5 mmol/l a aproximadamente 10,0 mmol/l de ácido etilendiaminatetraacético y tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0. En ejemplos preferidos de tales realizaciones, la mezcla de endopeptidasa específica de prolina y el reactivo aglutinador comprende de aproximadamente 1,0 g/dl a aproximadamente 2,0 g/dl de albúmina sérica bovina y de aproximadamente 1,0 mmol/l a aproximadamente 5,0 mmol/l de ácido etilendiaminatetraacético y tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 6,0 a
 35 aproximadamente 8,0. En ejemplos particularmente preferidos de tales realizaciones, la mezcla de endopeptidasa específica de prolina y el reactivo aglutinador comprende de aproximadamente 1,4 g/dl a aproximadamente 1,6 g/dl de albúmina sérica bovina y de aproximadamente 2,9 mmol/l a aproximadamente 3,1 mmol/l de ácido etilendiaminatetraacético y tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0.

45 Realizaciones particulares de la invención se refieren a métodos para detectar hemoglobina humana glicosilada en los que se pone en contacto una muestra con una endopeptidasa y con un reactivo aglutinador antes de poner en contacto la muestra con endopeptidasa específica de prolina. Si la muestra en tales métodos es sangre completa humana, la muestra, en algunos casos, puede diluirse inicialmente con, por ejemplo, solución salina.

50 Aspectos particulares de la invención se refieren por tanto a métodos que comprenden poner en contacto una muestra con una mezcla de una endopeptidasa y un reactivo aglutinador, seguido por poner en contacto la muestra con endopeptidasa específica de prolina, a lo que le sigue poner en contacto la muestra con un anticuerpo. Otras realizaciones de la invención se refieren a métodos que comprenden poner en contacto una muestra con una mezcla de una endopeptidasa y un reactivo aglutinador, seguido por poner en contacto la muestra con una mezcla de endopeptidasa específica de prolina y un anticuerpo. Realizaciones adicionales de la invención se refieren a métodos que comprenden poner en contacto una muestra con un reactivo aglutinador seguido por poner en contacto la muestra con pepsina, seguido por poner en contacto la muestra con endopeptidasa específica de prolina, seguido por poner en contacto la muestra con un anticuerpo. Aspectos adicionales de la invención se refieren a métodos que comprenden poner en contacto una muestra con un reactivo aglutinador seguido por poner en contacto la muestra con pepsina, seguido por poner en contacto la muestra con una mezcla de endopeptidasa específica de prolina y un anticuerpo. Otros aspectos de la invención se refieren a métodos que comprenden poner en contacto una muestra con pepsina seguido por poner en contacto la muestra con un reactivo aglutinador, seguido por poner en contacto la muestra con endopeptidasa específica de prolina, seguido por poner en contacto la muestra con un anticuerpo. Determinadas realizaciones adicionales de la invención se refieren a métodos que comprenden poner en contacto una muestra con pepsina seguido por poner en contacto la muestra con un reactivo aglutinador, seguido por poner en contacto la muestra con una mezcla de endopeptidasa específica de prolina y un anticuerpo.

Aspectos de la invención se refieren por tanto a métodos para detectar hemoglobina humana glicosilada que comprenden poner en contacto una muestra que va a someterse a prueba para detectar hemoglobina humana glicosilada con una endopeptidasa o bien simultáneamente con, antes de, o bien tras poner en contacto la muestra con un reactivo aglutinador, poner en contacto la muestra tratada con endopeptidasa y reactivo aglutinador con endopeptidasa específica de prolina, y detectar el pentapéptido amino-terminal de la cadena β glicosilada de hemoglobina humana con un inmunoensayo de inhibición de la aglutinación. En realizaciones preferidas de tales métodos, la muestra se pone en contacto con una mezcla de pepsina y el reactivo aglutinador, que comprende preferiblemente pepsina de aproximadamente 3 U/ml a aproximadamente 100 U/ml y tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 4,0.

Aspectos adicionales de la invención se refieren a métodos para detectar hemoglobina humana glicosilada que comprenden poner en contacto una muestra que va a someterse a prueba para detectar hemoglobina humana glicosilada con una endopeptidasa o bien simultáneamente con, antes de, o bien tras poner en contacto la muestra con un reactivo aglutinador, poner en contacto la muestra tratada con endopeptidasa y reactivo aglutinador con endopeptidasa específica de prolina o bien simultáneamente con o bien tras poner en contacto la muestra con un anticuerpo que se une específicamente tanto al pentapéptido amino-terminal de la cadena β glicosilada de hemoglobina humana como al reactivo aglutinador, y detectar el pentapéptido amino-terminal de la cadena β glicosilada de hemoglobina humana con un inmunoensayo de inhibición de la aglutinación. En realizaciones preferidas de tales métodos, la muestra tratada con endopeptidasa y reactivo aglutinador se pone en contacto con una mezcla de endopeptidasa específica de prolina y el anticuerpo, que comprende preferiblemente endopeptidasa específica de prolina de aproximadamente 2,0 U/ml a aproximadamente 30,0 U/ml y tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,0.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de determinadas realizaciones de la invención y no debe considerarse que limitan el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Digestión de muestras de sangre completa humana con pepsina y endopeptidasa específica de prolina

Se incubaron 7,5 μ l de DCA N (control normal, kit de reactivo analizador DCA® 2000 (Siemens Medical Solutions Diagnostics)) o DCA AB (control anómalo, kit de reactivo analizador DCA® 2000 (Siemens Medical Solutions Diagnostics)) a temperatura ambiente durante 20 minutos con 150 μ l de reactivo desnaturalizante de muestras (kit de reactivo de HbA1c ADVIA® (Siemens Medical Solutions Diagnostics)) que contenía pepsina 250 U/ml. Se añadieron 150 μ l de endopeptidasa específica de prolina (30 U/ml) en tampón fosfato 0,1 mol/l, pH 7,0, a la mitad de las muestras tratadas con pepsina, y se incubaron las muestras tratadas con endopeptidasa específica de prolina durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras tratadas con pepsina restantes no se trataron con endopeptidasa específica de prolina, y se añadieron 150 μ l de tampón fosfato 0,1 mol/l, pH 7,0, a esas muestras.

Entonces se sometieron a prueba todas las muestras en un inmunoensayo de inhibición de la aglutinación en un instrumento ADVIA® 1650 añadiendo las muestras a una mezcla de látex recubierto con anticuerpo monoclonal de ratón anti-HbA1c (kit de reactivo de HbA1c ADVIA®, R1 (Siemens Medical Solutions Diagnostics)) seguido por la adición del sexapéptido glicosilado amino-terminal de la cadena β de hemoglobina humana conjugado con poliaspartamida (reactivo aglutinador, kit de reactivo de HbA1c ADVIA®, R2 (Siemens Medical Solutions Diagnostics)). El pentapéptido glicosilado amino-terminal de la cadena β de hemoglobina humana en la muestra compite con el reactivo aglutinador por sitios de unión del anticuerpo y ralentiza la velocidad de aglutinación, lo que se produce cuando el reactivo aglutinador se une al anticuerpo recubierto sobre látex. Cuanto más pentapéptido glicosilado amino-terminal de la cadena β de hemoglobina humana esté presente en la muestra, más lenta será la velocidad de aglutinación. Se monitorizó la reacción a 694 nm y se determinó la diferencia en las velocidades de aglutinación entre las muestras tratadas y un blanco de solución salina. Los resultados de los experimentos se enumeran en la tabla 1 a continuación e indican que tras el tratamiento con pepsina, la adición de endopeptidasa específica de prolina da como resultado una inhibición de la aglutinación superior, demostrando que se libera el pentapéptido glicosilado terminal de la cadena β de hemoglobina.

Tabla 1

Muestra	20 min de pepsina	20 min de pepsina + 30 min de PSE (30 U/ml)
DCAN	-0,13856	-0,17681
DCA AB	-0,19191	-0,21345

Ejemplo 2: Formulación de un reactivo aglutinador que contiene endopeptidasa específica de prolina

Se determinaron las condiciones para la formulación estable de un reactivo que contenía el aglutinador usado en el ejemplo 1 (sexapéptido glicosilado amino-terminal de la cadena β de hemoglobina humana conjugado con poliaspartamida) u endopeptidasa específica de prolina a pH 7,0.

Se prepararon disoluciones del aglutinador (aproximadamente 1,5 µg/ml) que contenían ácido morfolino-propano-sulfónico 0,02 mol/l (MOPS), NaN₃ al 0,05% y Tween-20 al 0,2%, pH 7 o bien sin ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) y endopeptidasa específica de prolina 0,4 U/ml, con EDTA 1,1 mmol/l, o bien tanto con EDTA 1,1 mmol/l como con endopeptidasa específica de prolina 0,4 U/ml. Entonces se determinó la capacidad del aglutinador en las diversas formulaciones para provocar la aglutinación de látex recubierto con anticuerpo monoclonal de ratón anti-HbA1c a lo largo de un periodo de 14 días para evaluar la capacidad del aglutinador a lo largo del tiempo. Se sometieron a prueba muestras en un inmunoensayo de inhibición de la aglutinación en un instrumento ADVIA® 1650 añadiendo en primer lugar las muestras al reactivo aglutinador descrito anteriormente (R1) y luego añadiendo látex recubierto con anticuerpo monoclonal de ratón anti-HbA1c (kit de reactivo de HbA1c ADVIA®, (Siemens Medical Solutions Diagnostics)) a las muestras. El pentapéptido glicosilado amino-terminal de la cadena β de hemoglobina humana en las muestras compite con el reactivo aglutinador por sitios de unión del anticuerpo y ralentiza la velocidad de aglutinación, lo que se produce cuando el reactivo aglutinador se une al anticuerpo recubierto sobre látex. Cuanto más pentapéptido glicosilado amino-terminal de la cadena β de hemoglobina humana esté presente en las muestras, más lenta será la velocidad de aglutinación. Se monitorizaron las reacciones a 694 nm y se determinaron las velocidades de aglutinación. La figura 1 ilustra que el aglutinador tenía estabilidad máxima en presencia de EDTA solo y tenía estabilidad mínima en presencia tanto de EDTA como de endopeptidasa específica de prolina.

Se prepararon disoluciones adicionales del aglutinador (aproximadamente 1,5 µg/ml) que contenían endopeptidasa específica de prolina 0,4 U/ml, ácido morfolino-propano-sulfónico 0,02 mol/l (MOPS), NaN₃ al 0,05% y Tween-20 al 0,2%, pH 7 tanto con EDTA 1,1 mmol/l como con BSA al 1% o con sólo BSA al 1%. Se determinó de nuevo la capacidad del aglutinador en las diversas formulaciones para provocar la aglutinación de látex recubierto con anticuerpo monoclonal de ratón anti-HbA1c a lo largo del tiempo. La figura 2 ilustra que el aglutinador en presencia de endopeptidasa específica de prolina era más estable en disoluciones que contenían tanto albúmina sérica bovina (BSA) como EDTA que si estaba en disoluciones que contenían BSA sólo. Los datos proporcionados en las figuras 1 y 2 indican que EDTA y BSA actúan de manera sinérgica para estabilizar disoluciones de reactivo aglutinador que contienen endopeptidasa específica de prolina.

Ejemplo 3: Determinación de las condiciones de digestión con pepsina

Se digirieron manualmente muestras de 2 µl de sangre completa humana liofilizada que contenía diversas concentraciones de HbA1c (calibradores de HbA1c de sangre completa, Aalto Scientific) con 148 µl de pepsina 250 U/ml (reactivo desnaturalizante de muestras (kit de reactivo de HbA1c ADVIA® (Siemens Medical Solutions Diagnostics)) durante 10 minutos, se digirieron durante nueve segundos con pepsina aproximadamente 6000 U/ml en una disolución de citrato 0,02 mmol/l, Triton X100 al 0,2% pH 2,4 de un modo automatizado, o se digirieron durante diez minutos con pepsina aproximadamente 6000 U/ml en una disolución de citrato 0,02 mmol/l, Triton X100 al 0,2% pH 2,4 de un modo automatizado. Entonces se evaluaron las muestras en un inmunoensayo de inhibición de la aglutinación en un instrumento ADVIA® 1650 tal como se describe en el ejemplo 2 en el que R1 era el reactivo aglutinador que contenía endopeptidasa específica de prolina 0,4 U/ml. La falta de cambio entre las velocidades de aglutinación enumeradas para las diferentes condiciones de desnaturalización para cada muestra respectiva en la tabla 2 a continuación indica que 9 segundos son suficientes para que el desnaturalizante de pepsina que contiene aproximadamente 6000 U/ml digiera la hemoglobina.

Tabla 2

Conc. de muestra (µmol/l) de HbA1c	Manual, 10 min, con desnaturalizante de muestras, pepsina ~250 U/ml	Automatizado, 9 s, con pepsina ~6000 U/ml	Automatizado, 10 min, con pepsina ~6000 U/ml
Velocidad de aglutinación			
0,00	0,27170	0,27137	0,27137
2,37	0,11992	0,11749	0,11868
3,79	0,06581	0,06694	0,06621
4,75	0,04172	0,04162	0,04224
6,38	0,02632	0,02630	0,02581

Ejemplo 4: La digestión con pepsina y endopeptidasa específica de prolina de sangre completa humana reduce la interferencia provocada por hemoglobina S y hemoglobina C cuando se calcula el porcentaje de hemoglobina glicosilada: Digestión con endopeptidasa específica de prolina en presencia de un reactivo aglutinador

Se sometieron a prueba muestras de sangre completa humana que contienen hemoglobina S (HbS) o hemoglobina C (HbC) en un inmunoensayo de inhibición de la aglutinación en un instrumento ADVIA® 1650 tal como se describe en el ejemplo 2 para determinar la concentración de hemoglobina glicosilada en las muestras. El reactivo de endopeptidasa contenía pepsina aproximadamente 6000 U/ml en tampón citrato 0,02 mol/l, pH 2,4, Triton X100 al 0,2%. El reactivo aglutinador contenía una mezcla de aglutinador aproximadamente 1,5 µg/ml (sexapéptido glicosilado amino-terminal de la cadena β de hemoglobina humana conjugado con poliaspartamida) y

concentraciones crecientes de endopeptidasa específica de prolina (0 U/ml, 0,1 U/ml, 0,2 U/ml, 0,33 U/ml, 0,43 U/ml y 0,54 U/ml) en una disolución de MOPS 0,02 mol/l pH 7,0, NaN₃ al 0,05%, Tween-20 al 0,2%, EDTA 3 mmol/l y BSA al 1,5%.

5 La concentración de hemoglobina total, que incluye hemoglobina tanto glicosilada como no glicosilada, en las muestras se determinó usando el reactivo de hemoglobina total ADVIA® (kit de reactivo de HbA1c ADVIA® (Siemens Medical Solutions Diagnostics)) en un ensayo basado en la conversión de todos los derivados de hemoglobina en hematina alcalina tras el tratamiento con una disolución alcalina de un detergente iónico. Se añadieron las muestras al reactivo de hemoglobina total y se convirtieron las especies de hemoglobina en hematina alcalina, que tiene un espectro de absorción definido a 596 nm. Se midió el contenido en hematina determinando la absorción a 596 nm.

10 Se determinó el porcentaje de hemoglobina glicosilada presente en cada muestra dividiendo la concentración de hemoglobina glicosilada calculada para cada muestra entre la concentración de hemoglobina total determinada para la muestra.

15 Para fines comparativos, también se determinó el porcentaje de hemoglobina glicosilada presente en muestras de sangre completa humana que contienen hemoglobina S y hemoglobina C usando el ensayo de HbA1c DCA® 2000 (kit de analizador y reactivo DCA® 2000 (Siemens Medical Solutions Diagnostics)). Se sabe que el ensayo DCA® 2000 no tiene interferencia resultante de la presencia de las variantes hemoglobina C y hemoglobina S. También se determinó el porcentaje de hemoglobina glicosilada presente en las muestras usando un ensayo de HbA1c convencional realizado usando el método de HbA1c ADVIA® 1650 (Siemens Medical Solutions Diagnostics). Se usaron los parámetros enumerados en la tabla 3 a continuación en un instrumento ADVIA® 1650 para evaluar el efecto de endopeptidasa específica de prolina sobre la interferencia de variantes de hemoglobina. R1 era una mezcla del aglutinador (sexapéptido glicosilado amino-terminal de la cadena β de hemoglobina humana conjugado con poliaspartamida) y endopeptidasa específica de prolina 0,0-0,54 U/ml en una disolución de MOPS 0,02 mol/l pH 7,0, NaN₃ al 0,05%, Tween-20 al 0,2%, EDTA 3,0 mmol/l y BSA al 1,5%. R2 era látex recubierto con anticuerpo monoclonal de ratón anti-HbA1c (kit de reactivo de HbA1c ADVIA® (Siemens Medical Solutions Diagnostics)).

30 Tabla 3

	Volumen (μl)
R1	76
R2	76
Muestra	3,2
Tratamiento previo	
Dilución	Especial
Reactivo de pepsina	148
Muestra	2
Posición de dil.	CTT
Tipo de ensayo	2PA
m	56
n	72
l	0
Longitud de onda	694 nm
Método de calc.	MSTD
Ajuste de la curva	Log-Logit 3

35 Los resultados de los experimentos se presentan en la tabla 4 a continuación. "NV" en la tabla indica que no se obtuvo un valor en ese punto de datos, y ">>>>" indica que el valor era demasiado alto como para que lo midiera el instrumento. Una "C" tras las designaciones numéricas en la columna 1 de la tabla indica que la muestra contiene hemoglobina C, y una "S" tras las designaciones numéricas en la columna 1 indica que la muestra contiene hemoglobina S. Los resultados obtenidos con el ensayo de HbA1c realizado usando el método de HbA1c ADVIA® 1650 se ven enormemente afectados por la presencia de hemoglobina S y hemoglobina C en las muestras en comparación con los resultados obtenidos con el ensayo de HbA1c DCA® 2000. La comparación de los resultados de experimentos realizados usando diferentes concentraciones de endopeptidasa específica de prolina con los resultados de experimentos realizados usando el ensayo de HbA1c DCA® 2000 y usando el instrumento ADVIA® 1650 ilustra que la interferencia en la medición de hemoglobina glicosilada provocada por la hemoglobina S y hemoglobina C se elimina a una concentración de endopeptidasa específica de prolina de 0,54 U/ml.

45 Tabla 4

Muestra	DCA	PSE 0,0 U/ml	PSE 0,1 U/ml	PSE 0,2 U/ml	PSE 0,33 U/ml	PSE 0,43 U/ml	PSE 0,54 U/ml	ADVIA 1650
6C	8,7	11,97	10,56	10,09	9,44	8,97	8,72	11,88

14C	6,8	8,26	7,74	7,09	6,93	6,95	6,56	8,07
18C	7,4	8,63	8,44	8,50	8,40	7,86	7,94	7,97
42C	6,2	7,61	7,02	6,65	6,47	6,37	6,10	7,67
46C	6	6,90	6,55	6,39	6,12	6,10	5,83	6,90
47C	6,5	8,03	7,10	6,92	6,59	6,70	6,33	7,79
64C	9,3	12,67	11,44	10,84	10,29	9,85	9,53	15,07
97C	5,5	8,37	7,91	7,46	7,17	6,83	6,62	8,44
126C	8,6	12,47	11,58	10,92	10,20	9,42	9,42	13,08
187S	6,8	7,42	7,02	6,73	6,62	6,77	6,74	7,92
188S	6,1	7,41	6,82	6,46	6,43	6,17	6,12	7,41
191C	6	7,76	7,34	6,80	6,72	6,39	6,12	7,83
192S	6,5	7,69	7,17	6,81	6,58	6,29	6,08	7,75
213S	6,4	7,44	6,93	6,52	6,26	6,09	5,96	7,62
214S	5,6	7,18	6,43	6,16	5,87	5,68	5,64	7,07
215S	6,1	7,87	7,34	NV	6,63	6,55	6,29	7,90
221S	6,8	8,11	7,78	7,63	7,09	7,20	6,95	8,39
222C	7,2	10,69	9,88	9,05	8,46	7,93	7,88	10,69
236C	5,9	8,02	7,47	7,23	6,70	6,50	6,36	8,09
239S	5,6	6,80	6,59	6,07	6,18	5,74	5,70	6,85
244S	5,6	6,48	619	5,92	5,70	5,68	5,55	6,73
245C	6,6	8,46	7,77	7,82	7,44	7,28	7,16	8,51
246S	8,2	11,22	9,76	9,48	9,00	8,42	8,23	10,75
248S	13	19,61	17,29	16,00	14,63	12,98	13,11	>>>>
251C	5,9	7,22	6,91	6,62	6,46	6,31	6,07	7,37
252S	6,2	7,41	6,91	6,56	6,46	6,26	6,26	7,47
253C	6,3	8,72	8,43	7,59	7,24	7,07	6,79	8,76

5 El porcentaje de hemoglobina glicosilada presente en las muestras, tal como se calcula a partir de experimentos realizados con un instrumento ADVIA® 1650 usando las diferentes concentraciones de endopeptidasa específica de prolina (tabla 4, columnas 3 a 8) y realizados usando el método de HbA1c ADVIA® 1650 (tabla 4, columna 9), se representaron gráficamente frente a los porcentajes de hemoglobina glicosilada calculados usando el ensayo de HbA1c DCA® 2000 (tabla 4, columna 2) para obtener pendientes de correlación para los porcentajes de hemoglobina glicosilada calculados a cada concentración de endopeptidasa específica de prolina y para los porcentajes calculados usando el método de HbA1c ADVIA® 1650. Los resultados se muestran en las figuras 3 a 9, que indican que a medida que aumentaba la concentración de endopeptidasa específica de prolina, disminuía la interferencia en el cálculo del porcentaje de hemoglobina glicosilada presente en las muestras provocada por hemoglobina S y hemoglobina C, hasta que se eliminó.

15 Se representaron gráficamente los valores de las pendientes de correlación determinadas tal como se describe en el párrafo anterior y se ilustran en las figuras 3 a 9 frente a la concentración de endopeptidasa específica de prolina (figura 10), demostrando que la digestión de muestras de sangre completa humana que contienen hemoglobina S y hemoglobina C con pepsina seguido por digestión con endopeptidasa específica de prolina al menos 0,43 U/ml en presencia de un reactivo aglutinador elimina la interferencia provocada por hemoglobina S y hemoglobina C cuando se calcula el porcentaje de hemoglobina glicosilada presente en las muestras.

20 Ejemplo 5: La digestión con pepsina y endopeptidasa específica de prolina de sangre completa humana reduce la interferencia provocada por hemoglobina S y hemoglobina C cuando se calcula el porcentaje de hemoglobina glicosilada: Digestión con pepsina en presencia de un reactivo aglutinador

25 Se diluyeron muestras de sangre completa humana que contienen hemoglobina S y hemoglobina C con solución salina en un instrumento ADVIA 1650 usando los parámetros enumerados en la tabla 5.

Tabla 5

	Volumen (µl)
R1	76
R2	76
Muestra	3,2
Tratamiento previo	
Dilución	Especial
Solución salina	148
Muestra	2
Posición de dil.	CTT
Tipo de ensayo	2PA

m	56
n	72
l	0
Longitud de onda	694 nm
Método de calc.	MSTD
Ajuste de la curva	Log-Logit 3

Entonces se mezclaron las muestras diluidas con solución salina con un reactivo aglutinador que contenía aproximadamente 1,5 µg de aglutinador (sexapéptido glicosilado amino-terminal de la cadena β de hemoglobina humana conjugado con poliaspartamida) y pepsina 6 U/ml en tampón citrato 0,02 mol/l, pH 2,4, y se incubó la mezcla durante cinco minutos. Entonces se añadieron disoluciones de látex recubierto con anticuerpo monoclonal de ratón anti-HbA1c (kit de reactivo de HbA1c ADVIA®, (Siemens Medical Solutions Diagnostics)) que contenían concentraciones crecientes de endopeptidasa específica de prolina (0,0, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, o 5,0 U/ml) (pH 7) a la disolución de reactivo aglutinador/pepsina y se incubó la mezcla durante cinco minutos. Se determinaron las velocidades de aglutinación a 694 nm usando un instrumento ADVIA® 1650, y se usaron las velocidades de aglutinación para calcular la concentración de hemoglobina glicosilada S o hemoglobina C en las muestras.

Para fines comparativos, también se determinó el porcentaje de hemoglobina glicosilada presente en las muestras usando el ensayo de HbA1c DCA® 2000 (kit de analizador y reactivo DCA 2000® (Siemens Medical Solutions Diagnostics)).

Se determinó la concentración de hemoglobina total en las muestras según los procedimientos descritos en el ejemplo 4, y también se determinó el porcentaje de hemoglobina glicosilada presente en cada muestra tal como se describe en el ejemplo 4. Los resultados de los experimentos se presentan en la tabla 6 a continuación e indican que la digestión de muestras de sangre completa humana con pepsina en presencia de un reactivo aglutinador seguido por digestión con endopeptidasa específica de prolina reduce significativamente la interferencia provocada por hemoglobina S y hemoglobina C presentes en las muestras cuando se calcula el porcentaje de hemoglobina glicosilada presente en las muestras.

Tabla 6

PSE U/ml	0 U/ml	1 U/ml	2 U/ml	3 U/ml	4 U/ml	5 U/ml	DCA
ID de la muestra	% de Hb glicosilada						
185S	10,36	10,95	9,71	8,89	8,65	8,55	10,1
180C	6,25	5,93	5,54	5,29	5,14	5,10	5,6
22C	13,72	11,33	10,72	9,42	9,00	8,61	9,12
172S	12,22	11,03	10,43	9,86	9,53	9,00	10,6

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar hemoglobina humana glicosilada que comprende:
 - 5 poner en contacto una muestra que va a someterse a prueba para detectar hemoglobina humana glicosilada con una endopeptidasa;
 - poner en contacto la muestra tratada con endopeptidasa con endopeptidasa específica de prolina; y
 - 10 detectar el pentapéptido amino-terminal de la cadena β glicosilada de hemoglobina humana.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra es sangre completa humana.
3. Método según la reivindicación 1, que comprende determinar el porcentaje de hemoglobina humana glicosilada en la muestra.
4. Método según la reivindicación 1, en el que la endopeptidasa es una endopeptidasa ácida seleccionada del grupo que consiste en pepsina, aspergillopepsina II, catepsina D, sacaropepsina, mucorpepsina, quimosina, gastricsina y fisirolisina.
 - 20 5. Método según la reivindicación 4, en el que la endopeptidasa ácida es pepsina, que comprende poner en contacto la muestra con pepsina de aproximadamente 5 U/ml a aproximadamente 10.000 U/ml a un pH en el intervalo de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 5,0.
- 25 6. Método según la reivindicación 1, que comprende poner en contacto la muestra tratada con endopeptidasa con endopeptidasa específica de prolina de aproximadamente 0,1 U/ml a aproximadamente 30 U/ml a un pH en el intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 9,0.
- 30 7. Método según la reivindicación 1, que comprende detectar el pentapéptido amino-terminal de la cadena β glicosilada de hemoglobina humana con un método que comprende el uso de cromatografía de líquidos de alta resolución o que comprende la unión de al menos un anticuerpo al pentapéptido glicosilado.
8. Método según la reivindicación 1, que comprende detectar el pentapéptido amino-terminal de la cadena β glicosilada de hemoglobina humana con un inmunoensayo de inhibición de la aglutinación.
 - 35 9. Método según la reivindicación 8, en el que el reactivo aglutinador usado en el inmunoensayo de inhibición de la aglutinación es un sexapéptido de Val-His-Leu-Thr-Tyr-Cys glicosilado conjugado con poliaspartamida.
- 40 10. Método según la reivindicación 8, que comprende poner en contacto la muestra tratada con endopeptidasa con endopeptidasa específica de prolina o bien simultáneamente con, antes de, o bien tras poner en contacto la muestra con un reactivo aglutinador o que comprende poner en contacto la muestra tratada con endopeptidasa con una mezcla de endopeptidasa específica de prolina y el reactivo aglutinador.
- 45 11. Método según la reivindicación 10, en el que la mezcla de endopeptidasa específica de prolina y el reactivo aglutinador comprende albúmina sérica bovina de aproximadamente 0,1 g/dl a aproximadamente 5,0 g/dl y ácido etilendiaminatetraacético de aproximadamente 0,5 mmol/l a aproximadamente 10,0 mmol/l y tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0.
- 50 12. Método según la reivindicación 10, que comprende además poner en contacto la endopeptidasa, la endopeptidasa específica de prolina y la muestra tratada con reactivo aglutinador con un anticuerpo que se une específicamente tanto al pentapéptido amino-terminal de la cadena β glicosilada de hemoglobina humana como al reactivo aglutinador.
- 55 13. Método según la reivindicación 14, en el que se une al menos una molécula de anticuerpo a una o más partículas de látex.
14. Método para detectar hemoglobina humana glicosilada según la reivindicación 1, que comprende:
 - 60 poner en contacto una muestra que va a someterse a prueba para detectar hemoglobina humana glicosilada con una endopeptidasa o bien simultáneamente con, antes de, o bien tras poner en contacto la muestra con un reactivo aglutinador;
 - poner en contacto la muestra tratada con endopeptidasa y reactivo aglutinador con endopeptidasa específica de prolina; y
 - 65

detectar el pentapéptido amino-terminal de la cadena β glicosilada de hemoglobina humana con un inmunoensayo de inhibición de la aglutinación.

- 5 15. Método según la reivindicación 14, en el que la endopeptidasa es una endopeptidasa ácida seleccionada del grupo que consiste en pepsina, aspergillopepsina II, catepsina D, sacaropepsina, mucorpepsina, quimosina, gastricsina o fisiolisina.
- 10 16. Método según la reivindicación 14, que comprende poner en contacto la muestra con una mezcla de pepsina y el reactivo aglutinador en el que la mezcla de pepsina y el reactivo aglutinador comprende pepsina de aproximadamente 3 U/ml a aproximadamente 100 U/ml y tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 4,0.
- 15 17. Método según la reivindicación 16, que comprende además poner en contacto la muestra tratada con endopeptidasa y reactivo aglutinador con endopeptidasa específica de prolina o bien simultáneamente con o bien antes de poner en contacto la muestra con un anticuerpo que se une específicamente tanto al pentapéptido amino-terminal de la cadena β glicosilada de hemoglobina humana como al reactivo aglutinador.
- 20 18. Método según la reivindicación 17, que comprende poner en contacto la muestra tratada con endopeptidasa y reactivo aglutinador con una mezcla de endopeptidasa específica de prolina y el anticuerpo.
- 25 19. Método según la reivindicación 18, en el que la mezcla comprende endopeptidasa específica de prolina de aproximadamente 2,0 U/ml a aproximadamente 30,0 U/ml y tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,0.
20. Método según la reivindicación 19, en el que se une al menos una molécula de anticuerpo a una o más partículas de látex.

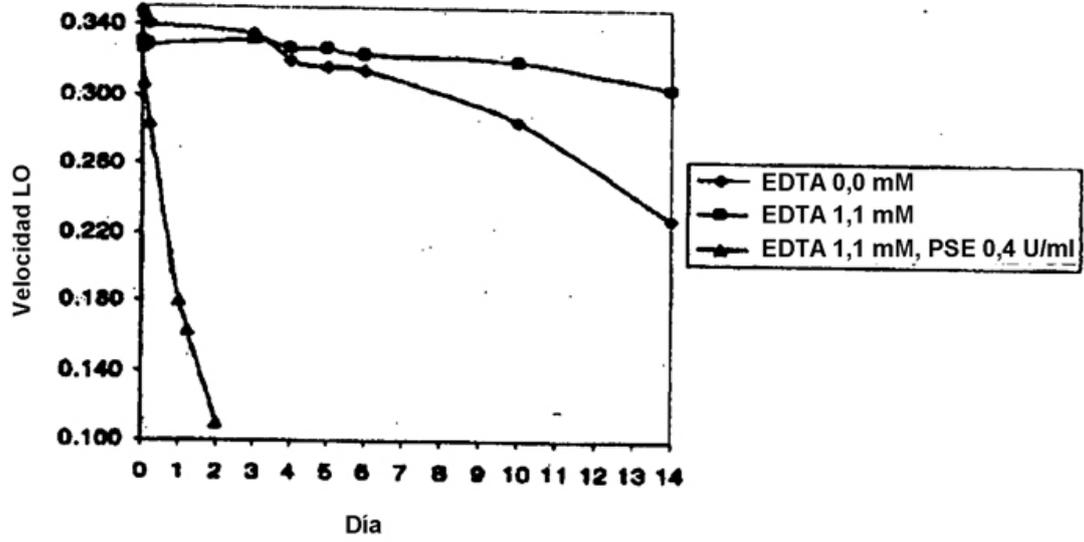


Figura 1

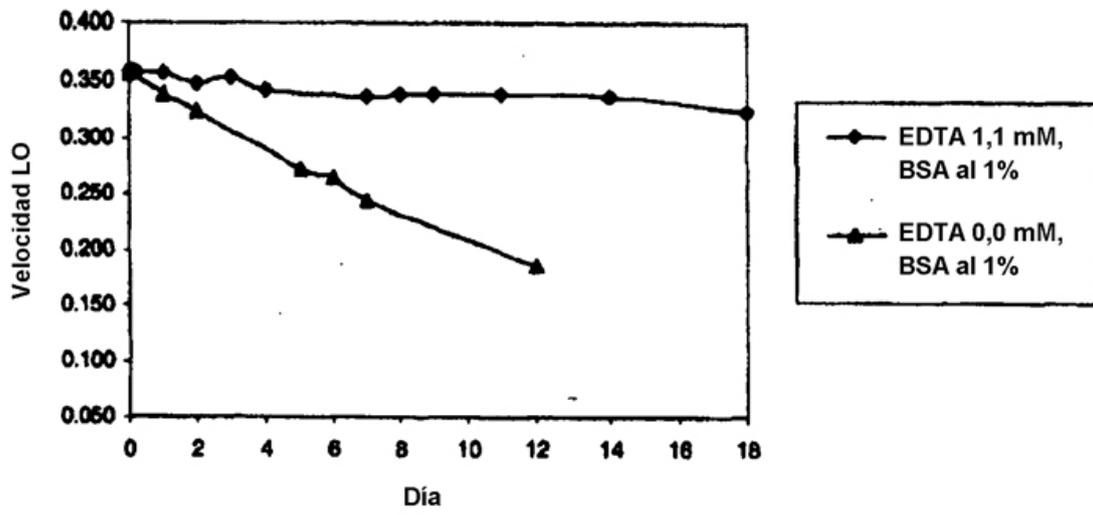


Figura 2

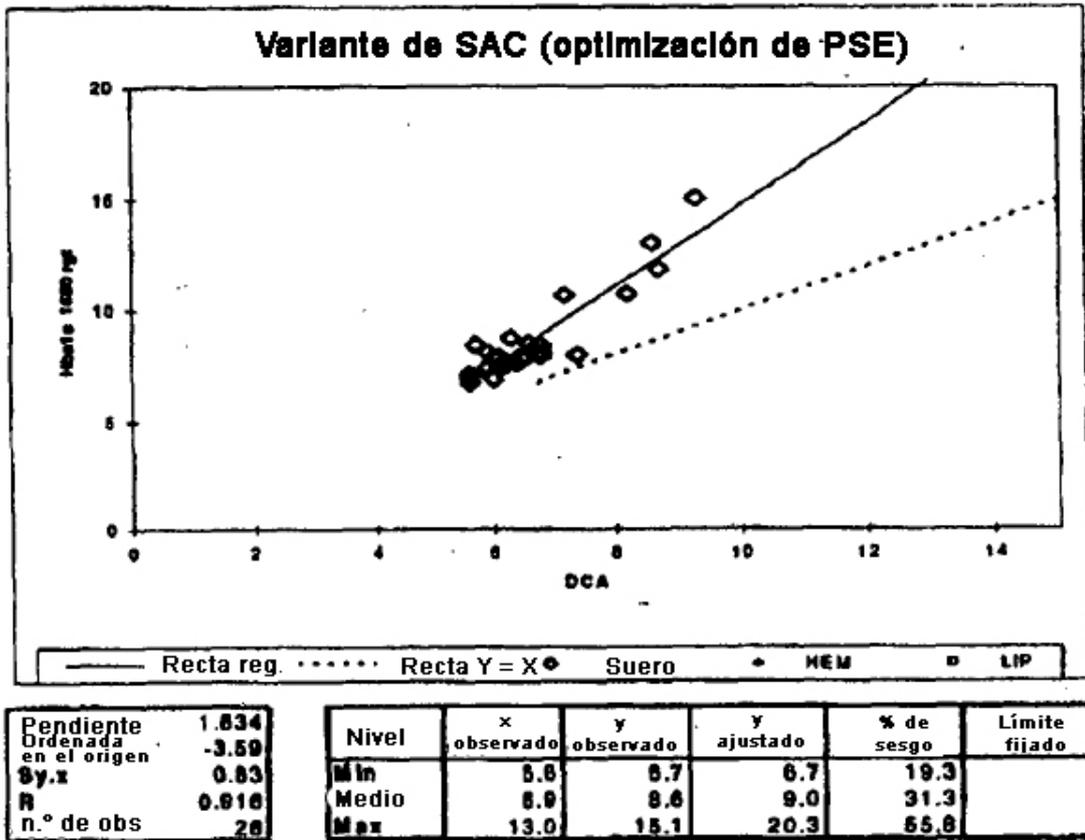


Figura 3

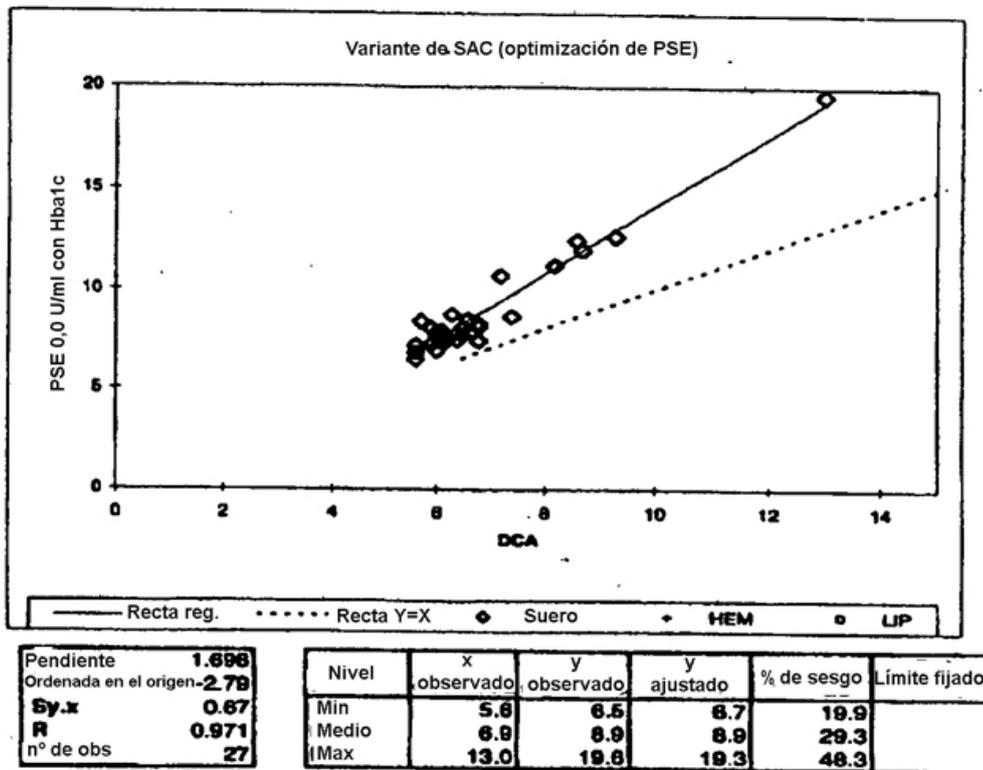


Figura 4

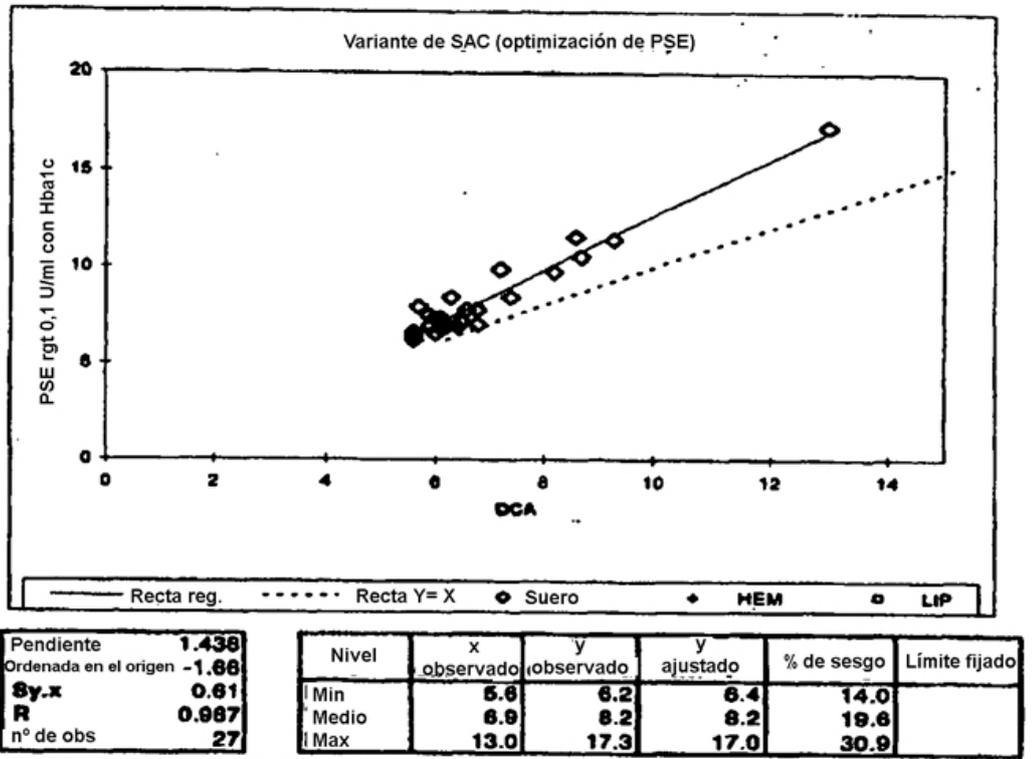
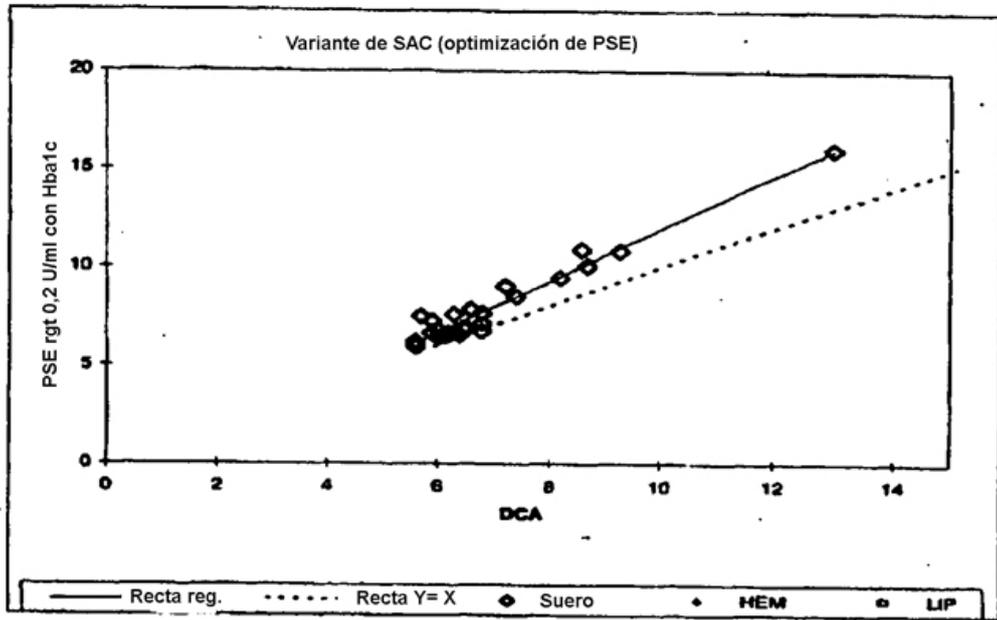


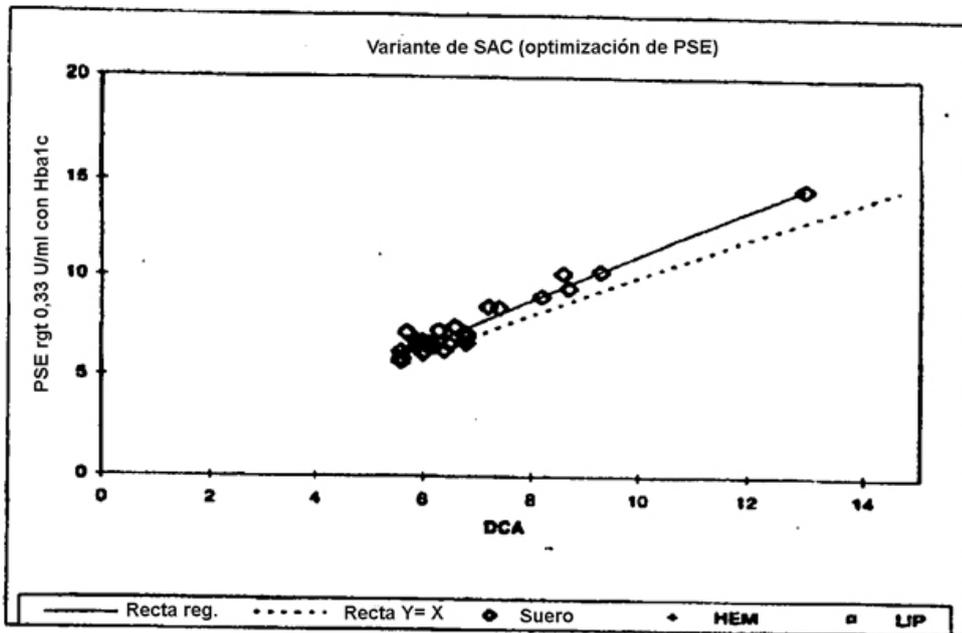
Figura 5



Pendiente	1.333
Ordenada en el origen	-1.37
Sy.x	0.52
R	0.973
n° de obs	26

Nivel	x observado	y observado	y ajustado	% de sesgo	Límite fijado
Min	5.6	5.9	6.1	8.9	
(Medio	6.9	7.9	7.8	13.5	
Max	13.0	16.0	16.0	22.8	

Figura 6



Pendiente	1.177
Ordenada en el origen	-0.62
Sy.x	0.43
R	0.975
n° de_obs	27

Nivel	x observado	y observado	y ajustado	% de sesgo	Límite fijado
Min	5.8	5.7	6.0	6.6	
Medio	6.9	7.5	7.5	8.8	
Max	13.0	14.6	14.7	12.9	

Figura 7

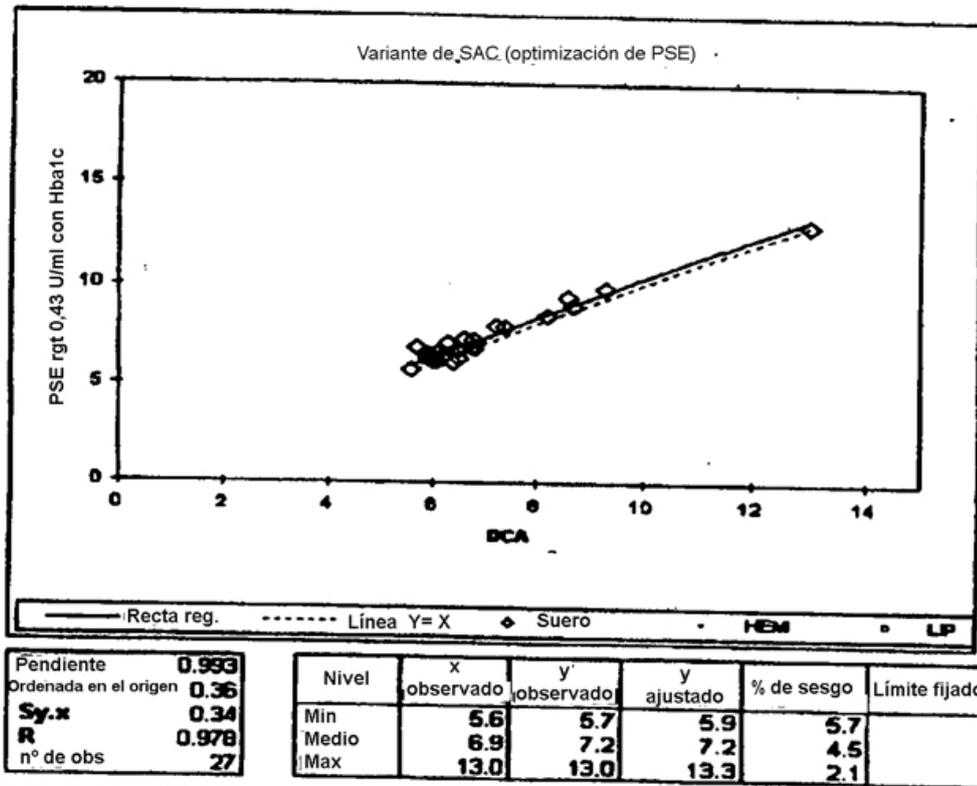


Figura 8

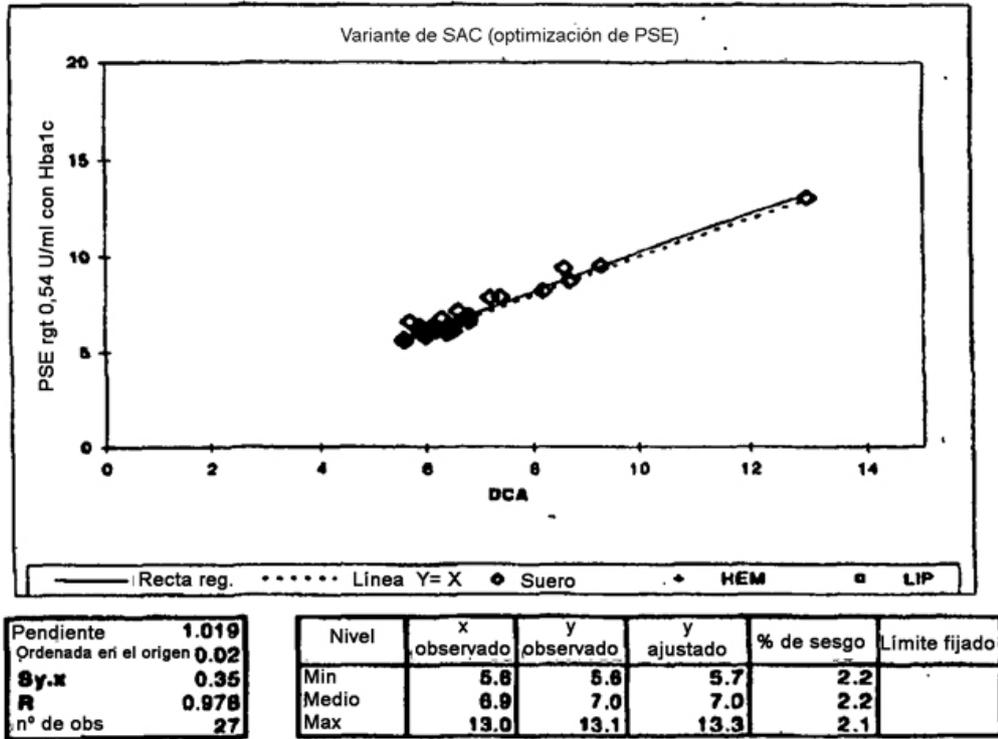


Figura 9

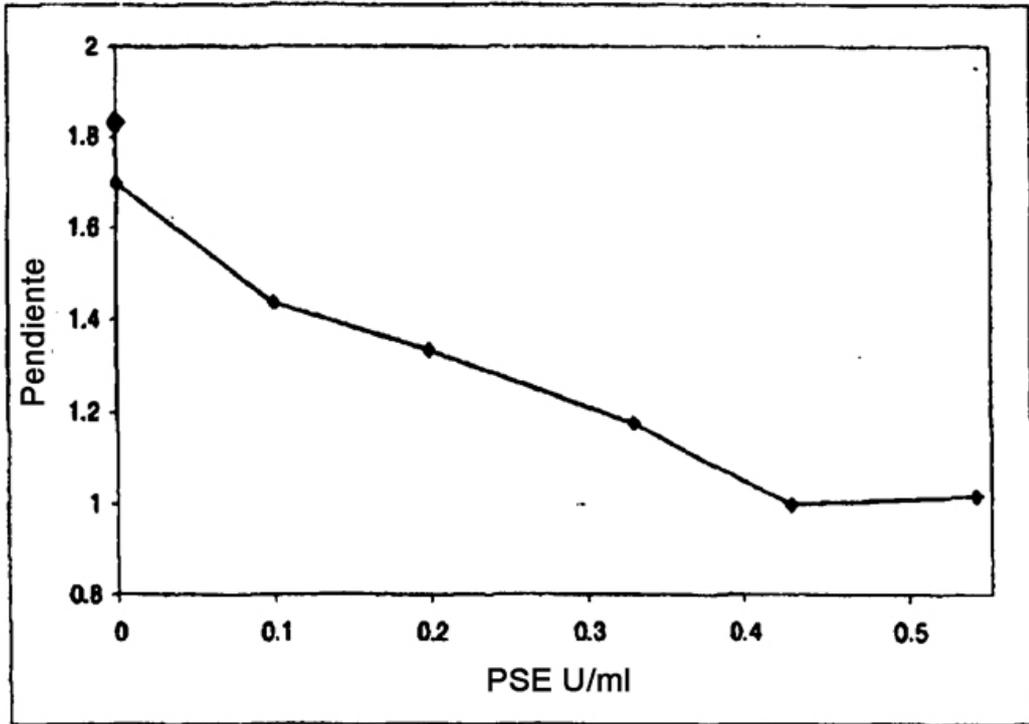


Figura 10