

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 880**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/26 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2002 E 10006587 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2248909**

54 Título: **Composición para el análisis de glicoproteínas**

30 Prioridad:

31.01.2001 JP 2001022953

16.02.2001 JP 2001039796

08.08.2001 JP 2001240002

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

12.01.2017

73 Titular/es:

ASAHI KASEI PHARMA CORPORATION (100.0%)

1-105 Kanda Jinbocho Chiyoda-ku

Tokyo 101-8101, JP

72 Inventor/es:

KOUZUMA, TAKUJI;

YOSHIOKA, ISSEI;

ARAI, MOTOO;

SUMITANI, JUNICHI y

IMAMURA, SHIGEYUKI

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Carlos

ES 2 596 880 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición para el análisis de glicoproteínas

5 SECTOR TÉCNICO

La presente invención se refiere a una composición para el análisis de proteínas glicosiladas y a un procedimiento de análisis de proteínas glicosiladas. La composición y el procedimiento de análisis de proteínas glicosiladas de la presente invención se puede utilizar en exámenes clínicos y puede determinar proteínas glicosiladas de manera precisa.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

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

Un procedimiento enzimático se considera como un procedimiento sencillo, fácil y barato para analizar con precisión proteínas glicosiladas. Las solicitudes de patente japonesas abiertas a Inspección pública Núm. 6-46846, Núm. 5-192193, Núm. 2-195900, y Núm. 2-195899, y las solicitudes de patente internacional Núm. WO 98/48043, y WO 97/13872 se indican como ejemplos de documentos que dan a conocer el procedimiento enzimático.

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

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

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

Como procedimiento para adsorber de forma selectiva globulina en sangre, es conocido un agente de tratamiento de la sangre que adsorbe endotoxinas y globulina en sangre utilizando el principio de la cromatografía y un copolímero de vinilo que introdujo un ligando que tiene un esqueleto de esteroide (solicitud de patente japonesa abierta a inspección pública Núm. 61-94663). Sin embargo, los resultados mostrados en la tabla 1 de los ejemplos de la solicitud de patente japonesa abierta a inspección Pública Núm. 61-94663 indican que solo se confirmó que fueron adsorbidas α 1-globulina y α 2-globulina, pero la γ -globulina que representa el 70% o más de los componentes de globulinas no fue adsorbida. Suponiendo que la γ -globulina fuera adsorbida, no puede anticiparse la capacidad del agente de tratamiento de la sangre de inhibir la actividad de las proteasas sobre la γ -globulina.

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

Como procedimiento para obviar los efectos del ácido ascórbico, es conocido un procedimiento de eliminación de forma química o enzimática del ácido ascórbico en muestras, utilizando una oxidasa de ácido ascórbico. Cuando se analizan los aminoácidos glicosilados, producidos por la fragmentación de las proteínas glicosiladas con una

proteasa utilizando una enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado, es preferente un procedimiento de previa eliminación de ácido ascórbico, utilizando una oxidasa de ácido ascórbico (ASOx) en el momento de la reacción con una proteasa, en vista de su reducido efecto sobre el sistema de coloración.

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

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

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

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

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

30 3) Técnica anterior relacionada con un procedimiento para el análisis preciso de albúmina

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

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

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

50 Tal como se ha mencionado anteriormente, la GA se deriva de la albúmina por glicosilación del grupo ε-amino, mientras que la GHb se obtiene por glicosilación del grupo α-amino de la valina del extremo N en la cadena β de la hemoglobina. Por lo tanto, cuando se aplica GA como objeto de medición, es deseable determinar solo los aminoácidos en los que ha sido glicosilado el grupo ε-amino.

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

60 CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

65 Un objetivo de la presente invención es dar a conocer, en la determinación de proteínas glicosiladas con precisión,

una composición en la que 1) se puede evitar el efecto de los componentes de globulinas y el ácido ascórbico y 2) se estabilizan las proteasas y enzimas que reaccionan, como mínimo, con un aminoácido glicosilado, y dar a conocer un procedimiento de estabilización.

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

10 1) Procedimiento para evitar el efecto de los componentes de globulinas y del ácido ascórbico

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

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

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

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

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

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

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

3) Procedimiento de análisis para determinar albúmina con precisión

Las investigaciones realizadas por los inventores de la presente invención han revelado, de forma inesperada, que la reactividad de BPC con GA difiere de la reactividad de BPC con NGA y que, si está presente una gran cantidad de

NGA, el valor analítico se ve afectado negativamente. Como resultado de extensos estudios, los inventores de la presente invención han descubierto que la albúmina en una muestra que contiene una gran cantidad de NGA puede determinarse con precisión mediante el tratamiento de la muestra con un agente desnaturizante de proteínas y/o un compuesto que tiene un enlace S-S, antes del análisis para determinar la albúmina o de forma simultánea al mismo.

4) Evitar el efecto de la hemoglobina glicosilada

Como resultado de extensos estudios de los problemas mencionados anteriormente, los inventores de la presente invención han preparado una FOD mutante, mediante la modificación de un gen de FOD originario de la cepa IFO-9972 de *Fusarium oxysporum* y se determinaron las propiedades de la FOD mutante, de modo que descubrieron que la especificidad por el sustrato cambia notablemente mediante la sustitución de la lisina 372 del extremo N por otro aminoácido. Además, los inventores de la presente invención han preparado varias FOD modificadas, que presentan solamente una reactividad extremadamente baja con la valina glicosilada y reaccionan casi específicamente con la lisina glicosilada.

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

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

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

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

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

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

< Procedimiento para medir la actividad de la proteasa >

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

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

< Procedimiento >

Se disolvió una solución de proteasa en una solución de dilución de enzima para obtener una concentración de 10-20 PU/ml. Se cargó 1 ml de esta solución en un tubo de ensayo y se calentó a 30°C. Se añadieron 5 ml de una solución de sustrato previamente calentada a 30°C. Exactamente 10 minutos después, se añadieron 5 ml de una solución de terminación de la reacción para terminar la reacción. La mezcla se calentó a 30°C durante 30 minutos para provocar que el precipitado sedimente. La mezcla se filtró a través de un filtro Toyo No. 131 (9 cm) para obtener un filtrado. Para el análisis en blanco, se calentó 1 ml de la solución de proteasa a 30°C en un tubo de ensayo, se añadieron 5 ml de la solución de terminación de la reacción, a continuación, se añadieron 5 ml de la solución de sustrato, después de lo cual el precipitado sedimentó y se filtró en de la misma manera. Se añadieron 5 ml de solución de carbonato de sodio 0,55 M y 1 ml de reactivo de Folin diluido 3 veces a 2 ml del filtrado. Después de la reacción a 30°C durante 30 minutos, se midió la absorbancia a 660 nm. El cambio de absorbancia se

determinó restando la absorbancia del blanco de la absorbancia de la muestra que reaccionó con la enzima. A continuación, se determinó la actividad enzimática utilizando una curva de actividad estándar preparada por separado.

5 <Preparación de la curva de actividad estándar>

Una solución de enzima ajustada a una concentración de aproximadamente 50 PU/ml se diluyó para preparar varias soluciones de enzimas con una serie de aumento de la dilución a una concentración de 2-50 PU/ml. El procedimiento anterior se aplicó a cada solución de enzima. El cambio de absorbancia resultante se marcó en el eje vertical y el aumento de la dilución se representó en el eje horizontal. Por otro lado, se preparó una solución de tirosina estándar (concentración de tirosina: 9,09 µg/ml) disolviendo L-tirosina en solución de ácido clorhídrico 0,2 N para obtener una concentración de 0,01% y la adición de 10 ml de solución de ácido clorhídrico 0,2 N al 1 ml de la solución de L-tirosina. El procedimiento de medición anterior se aplica a 2 ml de la solución de tirosina estándar y 2 ml de solución de ácido clorhídrico 0,2 N. El cambio de absorbancia resultante corresponde a 18,2 µg de tirosina. El cambio de absorbancia se representa en el gráfico anterior. El punto de intersección de una línea vertical, trazada desde el punto marcado y el eje horizontal corresponde a 10 PU/ml.

Estas proteasas se pueden utilizar en cualquier concentración en la que las proteínas diana pueden ser eficazmente digeridas en un período de tiempo especificado, habitualmente en el intervalo de 1-100.000 PU/ml y, preferentemente de 10-10.000 PU/ml, por ejemplo.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La mutación de la secuencia de aminoácidos del polipéptido que forma la FOD mutante se puede determinar a partir de la secuencia de bases del gen mutante. La FOD mutante obtenida por el procedimiento mencionado anteriormente puede producirse como un recombinante mediante la incorporación del gen de FOD mutante en un sistema huésped-vector adecuado.

Como vector en el que se incorpora el gen FOD mutante, son apropiados los vectores construidos para utilizar en recombinación de genes a partir de un fago o plásmido que puede crecer de forma autónoma en un microorganismo huésped. Como vectores de fagos, cuando se utiliza un microorganismo que pertenece a *E. coli* como microorganismo huésped se pueden utilizar, por ejemplo, λ gt- λ C, λ gt- λ B, y similares. Como vectores de plásmidos, cuando se utiliza *E. coli* como microorganismo huésped, se utilizan preferentemente, por ejemplo, los plásmidos pBR322, pBR325, pACYC184, pUC12, pUC13, pUC18, pUC19, pUC118, pIN I, y Bluescript KS+; cuando se utiliza *Bacillus subtilis* como microorganismo huésped, se pueden utilizar pUB110 y pKH300PLK; cuando se utiliza *Actinomyces* como microorganismo huésped, se pueden utilizar pIJ680 y pIJ702; y cuando se utiliza levadura, particularmente *Saccharomyces cerevisiae*, como microorganismo huésped, se pueden utilizar Yrp7, pYC1, y Yep3.

Para incorporar un gen de FOD mutante en el vector, obtenido de esta manera, se digieren el vector y el gen de FOD mutante con una endonucleasa de restricción adecuada, que puede producir los mismos terminales y fragmentos de ADN que contienen el gen de FOD mutante y se combinan los fragmentos de vector utilizando una ADN ligasa, según un procedimiento convencional.

Cualquier microorganismo puede utilizarse como microorganismo huésped, en el que se transfiere el vector combinado con el gen de FOD mutante, siempre que un ADN recombinante pueda crecer de forma estable y autónoma. Cuando el microorganismo huésped es un microorganismo que pertenece a *E. coli*, se pueden utilizar, por ejemplo, *E. coli* DH1, *E. coli* JM109, *E. coli* W3110, *E. coli* C600 y similares. Cuando el microorganismo huésped es un microorganismo que pertenece a *Bacillus subtilis*, se puede utilizar *Bacillus subtilis* ISW1214 y similares. Cuando el microorganismo huésped es un microorganismo que pertenece a *Actinomyces*, se puede utilizar *Streptomyces lividans* TK24 y similares. Cuando el microorganismo huésped es un microorganismo que pertenece a *Saccharomyces cerevisiae*, se puede utilizar *Saccharomyces cerevisiae* INVSC1 y similares.

Como procedimiento para incorporar ADN recombinante en el microorganismo huésped, cuando el microorganismo huésped pertenece a *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Streptomyces lividans*, por ejemplo, el ADN recombinante se puede transferir a los microorganismos huésped transformados en células competentes, según un procedimiento convencional. Se puede aplicar la electroporación en función del tipo de cepa.

Para preparar una FOD mutante, se puede emplear un procedimiento de cultivo del microorganismo huésped, en el que el gen de FOD mutante se ha introducido en un medio apropiado, recoger las células cultivadas, destruir las células mediante pulverización ultrasónica en una solución tampón apropiada o mediante un tratamiento con lisozima para preparar el extracto de células. Es posible añadir una secuencia señal para provocar la expresión por secreción, en la que la FOD mutante se acumula en el caldo de cultivo.

La FOD mutante producida de este modo se separa y se purifica mediante precipitación con sulfato amónico convencional, filtración en gel, purificación en columna, y similares, y se suministra como una preparación enzimática.

Los componentes se utilizan habitualmente en la técnica de manipulación génica mencionada anteriormente en una proporción, por ejemplo, aproximadamente de 1-10 U de la endonucleasa de restricción, aproximadamente de 300 U de ligasa y aproximadamente de 1-10 U de otras enzimas para 0,1-10 μ g de ADN y ADN del vector del microorganismo fuente.

Como ejemplos específicos de microorganismo transgénico que comprende el gen de FOD mutante y capaz de producir la FOD mutante, se pueden mencionar *Escherichia coli* JM109-pcmFOD3 (FERM BP-7847), un

microorganismo transgénico que tiene un microorganismo que pertenece a *Escherichia coli* como microorganismo huésped y que posee un plásmido pcmFOD3 que contiene el gen de FOD mutante en el mismo, *Escherichia coli* JM109:pcmFOD4, un microorganismo transgénico que posee pcmFOD4 y *Escherichia coli* JM109:pcmFOD5 (FERM BP-7848), un microorganismo transgénico que posee pcmFOD5. Las estructuras de estos plásmidos se muestran en la figura 7.

La *Escherichia coli* JM109:pcmFOD3 y la *Escherichia coli* JM109:pcmFOD5 se depositaron en el Depósito del Organismo Internacional de Patentes, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, Institución Administrativa Independiente (Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japón) el 16 de enero de 2001, con el número de depósito FERM BP-7847 y FERM BP-7848, respectivamente.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<Composición de la solución de reacción>

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

5 Se colocó 1 ml de la solución de reacción anterior en un pequeño tubo de ensayo y se precalentó a 37°C durante 5 minutos, a continuación se añadieron 0,02 ml de una solución de enzima diluida de forma adecuada. La mezcla se agitó para iniciar la reacción. Después de la reacción durante exactamente 10 minutos, se añadieron 2 ml de SDS al 10 0,5% para terminar la reacción. Se midió la absorbancia (As) a una longitud de onda de 500 nm. Como ensayo en blanco, se siguió el mismo procedimiento utilizando 0,02 ml de agua destilada en lugar de la solución de enzima para medir la absorbancia (Ab). La actividad enzimática se determinó a partir de la diferencia (As-Ab) entre la absorbancia (As) después de la reacción enzimática y la absorbancia del ensayo en blanco (Ab). La correlación entre la absorbancia y el peróxido de hidrógeno producido se determinó previamente utilizando una solución estándar de peróxido de hidrógeno. La cantidad de enzima que puede producir 1 μmol de peróxido de hidrógeno a 15 37°C en un minuto se define como 1 U. La fórmula de cálculo se muestra a continuación.

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

3,02: solución de reacción total (ml)
 20 0,02: solución enzimática total (ml)
 10: tiempo de reacción
 2: un coeficiente que indica la producción de una molécula de una materia colorante en la que 4-AA y fenol se condensan a partir de dos moléculas de peróxido de hidrógeno
 12,0: coeficiente de absorbancia (mM) 4-AA-fenol
 25 B: aumento de dilución de la solución enzimática

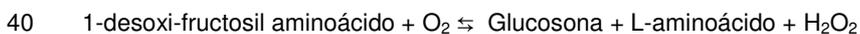
Entre las FOD mutantes obtenidas por el procedimiento mencionado anteriormente, la FOD mutante, en la que la lisina 372 en la secuencia de aminoácidos indicada en la Secuencia ID No. 1 se sustituye por triptófano, tiene las siguientes propiedades enzimáticas.

30 (1) Especificidad de sustrato

ZFL 100%
 FV 0%

35 (2) Reacción enzimática

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



(3) Peso molecular

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

(4) Punto isoelectrico

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

55 (5) Valor de Km

El valor de Km para un sustrato sintético ZFL, determinado mientras se cambia la concentración de ZFL en una

solución de reacción que contiene solución tampón de Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), 4-AA al 0,03%, fenol al 0,02% y peroxidasa 4,5 U/ml, fue de 3,4 mM.

(6) pH óptimo

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

(7) Estabilidad con el pH

15 Se incubaron 0,5 ml de las diferentes soluciones tampón que contenían 0,5 U de la enzima, cada una utilizada para la determinación del pH óptimo a una concentración de 0,5 M, a 40°C durante 10 minutos, y, a continuación, se determinaron estas actividades residuales, según el procedimiento de medición de actividad que se describe a continuación. Como resultado, se encontró que la enzima mantiene un 80% o más de actividad a pH 7,0-9,0.

(8) Estabilidad térmica

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

(9) Temperatura óptima

25 La enzima se hizo reaccionar, según el procedimiento de medición de actividad, utilizando solución tampón de Tris-HCl 40 mM (pH 7,5) a diferentes temperaturas. Después de la reacción durante 10 minutos, se añadieron 2 ml de lauril sulfato de sodio al 0,5% (en lo sucesivo indicado como "SDS") para terminar la reacción. Se midió la absorbancia (As) a una longitud de onda de 500 nm. Como resultado, la enzima mostró la actividad máxima a 50°C.
30

A continuación, se hace referencia a un procedimiento para medir la valina glicosilada en una muestra, utilizando una FOD que tiene una reactividad con la valina glicosilada, después de eliminar la lisina glicosilada en la solución de la muestra utilizando una FOD mutante con una reactividad muy reducida con la valina glicosilada, obtenida mediante la sustitución de la lisina 372 en la secuencia de aminoácidos indicada en la Secuencia ID NO: 1 por otro aminoácido.
35

Se puede utilizar cualquier FOD que no tenga reactividad con la valina glicosilada para eliminar la lisina glicosilada en una solución de muestra. Por ejemplo, se utiliza una FOD mutante con una reactividad muy reducida con la valina glicosilada obtenida mediante la sustitución de la lisina 372 en la secuencia de aminoácidos indicada en la Secuencia ID NO: 1 por otro aminoácido. Entre las FOD mutantes, se utiliza preferentemente la FOD mutante, en la que la lisina 372 en la secuencia de aminoácidos indicada en la Secuencia ID NO: 1 se sustituye por cualquiera entre triptófano, metionina y valina. La cantidad de enzima añadida a la solución de reacción puede ser una cantidad suficiente para eliminar la lisina glicosilada en la solución de la muestra, por ejemplo, de 0,5-200 U/ml, y más preferentemente de 1-50 U/ml.
40
45

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

Un procedimiento de medición específica comprende hacer reaccionar la lisina glicosilada en una solución de la muestra que contiene la lisina glicosilada y la valina glicosilada con FOD mutante en una primera reacción, descomponer el peróxido de hidrógeno producido en la reacción con catalasa o similares, haciendo reaccionar el peróxido de hidrógeno, que ha sido producido haciendo reaccionar la valina glicosilada en la solución de la muestra con FOD, en una segunda reacción, con 4-aminoantipirina (4-AA) y reactivo de Trinder, y medir colorimétricamente el color producido. Se puede añadir azida sódica a la segunda solución de reacción, que es un inhibidor de la catalasa.
55
60

Como inhibidor de proteasa que tiene selectividad por los componentes de globulinas, que se puede utilizar para analizar con precisión proteínas glicosiladas según la presente invención, se puede utilizar cualquier inhibidor que tenga selectividad por los componentes de globulinas, siempre que, como tal, el inhibidor pueda principalmente digerir proteínas distintas de los componentes de globulinas, cuando la solución de la muestra se hace reaccionar con una proteasa en presencia del inhibidor de proteasa que tiene selectividad por los componentes de globulinas. Como ejemplos preferentes, se pueden mencionar ácido desoxicólico, amida de ácido desoxicólico, amida de ácido
65

cólico, sal de amonio cuaternario, surfactante catiónico de tipo sal de amonio cuaternario, concanavalina A, glucósido de octilo y betaína.

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

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

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

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

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

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

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

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

La actividad de ASOx se midió mediante el procedimiento siguiente.

< Procedimiento de medición de actividad de ASOx >

45 < Solución sustrato de almacenamiento >

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

50 < Reactivo de reacción de mezcla >

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

55 < Procedimiento >

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

ascórbico en ácido dehidroascórbico en un minuto a 30°C se define como 1 U. La fórmula de cálculo se muestra a continuación.

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

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

5: tiempo de reacción (min)

4,10: solución de reacción total (ml)

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

B: aumento de dilución de la solución de enzima

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Como ejemplos preferentes del estabilizador, se pueden mencionar dimetilsulfóxido, alcohol, sal de calcio soluble en

agua, cloruro de sodio, sal de amonio cuaternario y surfactante catiónico de tipo sal de amonio cuaternario. Como ejemplos de alcohol se pueden mencionar etanol, propanol, etilenglicol y glicerol. Como ejemplos de la sal de amonio cuaternario y surfactante catiónico de tipo sal de amonio cuaternario se pueden mencionar lauril sulfato de trietanolamina, cloruro de lauriltrimetilamonio y similares.

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

Como estabilizador de la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado, utilizado para analizar con precisión proteínas glicosiladas según la presente invención, se puede utilizar cualquier compuesto que pueda suprimir una disminución de la actividad de la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado durante el almacenamiento del reactivo. Un compuesto que puede suprimir una disminución de la actividad de la enzima durante el almacenamiento del reactivo en estado líquido es particularmente preferente.

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

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

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

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

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

La proteasa se puede utilizar a una concentración a la que puede descomponer proteínas glicosiladas suficientemente en una muestra durante el tiempo de reacción utilizado en la práctica, preferentemente en el intervalo de 100-500.000 PU/ml y más preferentemente de 500-100.000 PU/ml.

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

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

reacciona, como mínimo, con los aminoácidos glicosilados.

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

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

15 En la formulación de la composición que contiene una enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado como primer reactivo y una proteasa como segundo reactivo, se pueden utilizar cualesquiera condiciones, siempre que el primer reactivo satisfaga las condiciones, tales como pH, concentración salina y similares, en las que la proteasa y la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado puedan mostrar actividad y el segundo reactivo satisfaga las condiciones en la cuales se puede almacenar adecuadamente la proteasa.

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

30 En la formulación de la composición para la reacción enzimática para analizar proteínas glicosiladas según la presente invención, se pueden seleccionar y añadir apropiadamente un surfactante, sal, agente tampón, agente regulador del pH, conservantes y similares.

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

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

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

65 Cuando se utiliza una oxidasa, por ejemplo, es preferente medir el consumo de oxígeno o la cantidad de productos

de reacción. Cuando se utiliza R-FOD, por ejemplo, se producen peróxido de hidrógeno y glucosona como productos de reacción. Tanto el peróxido de hidrógeno como la glucosona se pueden analizar de forma directa o indirecta mediante un procedimiento conocido.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

65 La proteína glicosilada a ser analizada utilizando la composición y el procedimiento de análisis de proteínas glicosiladas de la presente invención incluye GA y GHB, pero no se limita a estas, y se puede medir cualquier proteína glicosilada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 La figura 1 es un gráfico que muestra las curvas de medición y reproducibilidad de una solución de sustrato de HSA (4 g/dl), solución de sustrato de γ -globulina y solución de sustrato de globulina IV en el Ejemplo 4, según la presente invención.

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

La figura 3 es un gráfico que muestra una curva de medición de albúmina glicosilada obtenida mediante el experimento en el ejemplo 6, según la presente invención.

15 La figura 4 es un gráfico que muestra el efecto de los tipos de agentes tampón en la estabilización de la oxidasa de ácido ascórbico en la composición para analizar proteínas glicosiladas en el ejemplo 9, según la presente invención.

20 La figura 5 es un gráfico que muestra el efecto de los tipos de estabilizadores en la estabilización de proteasas en el ejemplo 11, según la presente invención.

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

25 La figura 7 muestra una estructura común a los plásmidos pcmFOD1 a pcmFOD5 del Ejemplo 20 de la presente invención.

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

35 La figura 9 es un gráfico que muestra la correlación entre el procedimiento enzimático, según la presente invención, y el procedimiento de HPLC en el resultado de la medición de albúmina glicosilada en el ejemplo 22, de la presente invención.

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

MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

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

Ejemplo 1

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

50 <Soluciones de sustrato>

55 1. Solución de sustrato de HSA; albúmina humana; esencialmente libre de globulinas; 25 mg/ml, GA (%) = 31,9%, valor de fructosamina (FRA) = 256 μ mol/l (fabricada por Sigma-Aldrich Co.); la concentración de albúmina en la solución de sustrato se analizó utilizando un kit de análisis de albúmina (Albúmina II-HA Test Wako; fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). El % de GA se analizó utilizando un analizador de albúmina glicosilada (GAA-2000, fabricado por ARKRAY, Inc.).

60 2. Soluciones de sustrato G-II y III, valor de FRA = 48 μ mol/l [globulinas humanas de la fracción II y III de Cohn; 16,9 mg/ml (fabricada por Sigma-Aldrich, Co.)].

3. Solución de sustrato G-IV, valor de FRA = 26 μ mol/l [globulinas humanas de la fracción IV de Cohn; 6 mg/ml (fabricada por Sigma-Aldrich, Co.)].

65 4. Solución de sustrato G-I, valor de FRA = 77 μ mol/l [Glovenin I: preparación de inmunoglobulinas (fabricada por Takeda Chemical Industries, Ltd.)].

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

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

<Preparación de la solución de reacción de proteasas>

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

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

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

<Composición de la solución de reacción>

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

30 <Procedimiento de reacción>

35 Se añadieron 300 µl de la solución de reacción anterior para analizar aminoácidos glicosilados a una celda y se incubó durante tres minutos a 37°C. Se midió la absorbancia a 555 nm (A₀). A continuación, se añadieron 30 µl de la muestra de reacción de la proteasa a la celda y se incubó durante cinco minutos a 37°C. Se midió la absorbancia a 555 nm (A₁). Se llevó a cabo el mismo procedimiento utilizando la muestra en blanco en lugar de la muestra de reacción de la proteasa. Se midieron las absorbancias (A₀ blanco y A₁ blanco). La reacción de la proteasa con las proteínas glicosiladas se indica mediante el cambio de absorbancia siguiente.

40 $\Delta A = (A_1 - A_0) - (A_1 \text{ blanco} - A_0 \text{ blanco})$

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

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

Nombre de la proteasa	Origen	ΔA		
		HSA	GI	Hb
Carboxipeptidasa A	Páncreas de vaca	<1	50	13
Aminopectidasa M		<1	21	<1
Proteasa tipo I		52	25	9
Tripsina		11	15	<1
Quimotripsina		25	103	7
Pancreatina		52	100	17
Carboxipeptidasa W	Trigo	7	18	1
Papaína	Papaya	15	5	<1
Proteasa tipo VIII		90	84	33
Proteasa tipo IX		33	12	<1
Proteasa tipo XXIV		172	91	2
Proteasa tipo XXVII		93	88	27
Alcalasa		92	49	17
Orientasa-22BF		<i>Bacillus</i>	168	51

Nombre de la proteasa	Origen	ΔA		
		HSA	GI	Hb
Orientasa-90N		136	44	5
Bioprasa SP-4FG		63	37	9
GODO-BAP		37	31	14
Toyozima NEP-160		130	47	23
Proteasa alcalofílica		133	50	19
Proteasa cristalina NAK		180	18	30
Proteasa tipo XIX	<i>Aspergillus</i>	20	22	33
Proteasa tipo XXIII		49	27	11
Flavourozima		59	17	25
Protin FN		37	20	<1
Proteasa A		44	16	19
Sumiteam MP		76	35	27
Sumizima FP		37	7	11
Newlasa F	<i>Rhizopus</i>	<1	18	9
Enzima PD	<i>Penicillium</i>	<1	19	1
Pronasa	<i>Streptomyces</i>	109	152	42
Proteasa tipo XIV		112	125	41
Proteasa tipo XXI		75	35	11
Proteasa tipo XVII	<i>Staphylococcus</i>	<1	20	<1
Carboxipeptidasa Y	<i>Levadura</i>	2	14	4
Proteinasa K	<i>Tritirachium</i>	79	45	32
Aminopectidasa T	<i>Thermus</i>	<1	18	<1
Acromopeptidasa	<i>Achromobacter</i>	24	3	16
Regelendproteínasa		13	26	7

Entre los componentes de globulinas, solo se describen los resultados para la solución de sustrato G-I en la tabla 1, debido a que todas las proteasas mostraron ausencia de reacción o sólo hubo una pequeña reacción con las proteínas glicosiladas en la solución de sustrato G-IV y los valores determinados para las soluciones de sustrato G-II y G-III fueron casi los mismos que los determinados para la solución de sustrato G-I. Como puede verse claramente en la tabla 1, las proteasas obtenidas de *Aspergillus* y la proteasa tipo XIV mostraron una buena reactividad con la globulina glicosilada en los componentes de globulinas.

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

Ejemplo 2

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

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

<Composición de la solución de reacción>

Reactivo proteolítico R-1

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

Reactivo de análisis de aminoácido glicosilado R-2

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

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

<Soluciones de sustrato>

1. Solución de sustrato de HSA: albúmina humana: 40 mg/ml, GA (%) = 10,5% [fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd., la concentración de albúmina en la solución de sustrato se analizó utilizando un kit de análisis de albúmina (albúmina II-HA Test Wako; fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). El % de GA se ensayó mediante un analizador de albúmina glicosilada (GAA-2000, fabricado por ARKRAY, Inc.).
2. Se añadió solución de sustrato de adición de γ -globulina, 17,0 mg/ml de γ -globulina [γ -Globulinas Humanas (fabricadas por Sigma-Aldrich, Co.), valor de fructosamina = 34 μ M], a la solución de sustrato de HSA anterior.

<Procedimiento de reacción>

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

Se calculó ΔA (HSA) restando el cambio de absorbancia de la muestra blanco del cambio de absorbancia obtenido para la solución de sustrato de HSA. Se calculó ΔA (+ γ -globulina) restando el cambio de absorbancia de la muestra blanco del cambio de absorbancia obtenido para la solución de sustrato a la que se añadió la γ -globulina.

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

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

Tabla 2. Cribado de inhibidores de proteasa selectivos de globulina

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

- Tal como se puede observar en la tabla 2, se identificó el efecto de inhibición de una reacción de la proteasa con globulina en ácido desoxicólico, amida de ácido desoxicólico, amida de ácido cólico, sal de amonio cuaternario o surfactante catiónico de tipo sal de amonio cuaternario, concanavalina A, octilglucósido, y betaína, confirmando que

principalmente se pueden digerir otras proteínas diferentes a globulina si se utilizan estos inhibidores de proteasa selectivos de componentes de globulina y proteasas.

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

Ejemplo 3

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

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

Reactivo proteolítico R-1

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

Reactivo de análisis de aminoácidos glicosilados R-2

El mismo que en el Ejemplo 2.

<Soluciones de sustrato>

Las mismas que en el Ejemplo 2.

<Procedimiento de reacción>

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

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

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

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

Además, incluso cuando se analiza GHb, el efecto de los componentes de globulinas también se podría evitar utilizando la presente invención.

Ejemplo 4

<Linealidad de la dilución de albúmina glicosilada>

5 Reactivo proteolítico R-1

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

Reactivo de análisis de aminoácidos glicosilados R-2

10 El mismo que en el Ejemplo 2.

<Soluciones de sustrato>

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

<Procedimiento>

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

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

35 Ejemplo 5

<Linealidad de la dilución de la hemoglobina glicosilada>

Reactivo proteolítico R-1

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

40 Reactivo R-2 de análisis de aminoácidos glicosilados

El mismo que en el Ejemplo 2.

45 <Soluciones de sustrato>

Se utilizaron la misma solución de sustrato de Hb que en el Ejemplo 1 y la misma solución de sustrato de γ -globulina y la solución de sustrato de globulina IV que en el Ejemplo 4.

50 <Procedimiento>

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

Como puede observarse en la figura 2, la absorbancia no varió al variar la concentración de la solución de sustrato

de γ -globulina o la solución de sustrato de globulina IV (GIV). Por otro lado, la solución de sustrato de Hb mostró una buena linealidad correspondiente a la concentración, lo que indica que se puede analizar hemoglobina glicosilada sin verse afectada sustancialmente por los componentes de globulinas. Se confirmó una reproducibilidad excelente de valor de CV = 2,0% con la concentración de Hb diluida 1,0 vez, lo que indica que, si se utiliza el procedimiento de análisis de la presente invención, se puede analizar selectivamente la hemoglobina glicosilada con buena sensibilidad y excelente reproducibilidad en un tiempo de reacción de 10 minutos.

Ejemplo 6

10 <Linealidad de la albúmina glicosilada>

Reactivo proteolítico R-1

El mismo que en el Ejemplo 4.

15

Reactivo R-2 de análisis de aminoácidos glicosilados

El mismo que en el Ejemplo 4.

20

<Soluciones de sustrato>

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

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

25

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

<Procedimiento>

30

El mismo que en el Ejemplo 3.

Los resultados se muestran en la figura 3.

35

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

40

Ejemplo 7

45

<Correlación entre los procedimientos de análisis de albúmina glicosilada por HPLC y por el procedimiento enzimático (la presente invención)>

Reactivo proteolítico R-1

50

El mismo que en el Ejemplo 4.

Reactivo de análisis de aminoácidos glicosilados R-2

El mismo que en el Ejemplo 4.

55

<Soluciones de sustrato>

Suero sanguíneo de diabéticos: 14 muestras

Suero sanguíneo de personas sanas: 25 muestras

60

<Procedimiento>

Se siguió el mismo procedimiento que en el Ejemplo 2.

65

Se identificó una correlación entre el procedimiento enzimático y un procedimiento de HPLC conocido, utilizando 14 muestras de suero sanguíneo de diabéticos. Se determinó la proporción de albúmina glicosilada mediante el

procedimiento de HPLC utilizando un analizador de albúmina glicosilada (GAA-2000, fabricado por ARKRAY, Inc.). El cambio de absorbancia obtenido en el procedimiento enzimático muestra una correlación muy alta con la proporción de albúmina glicosilada (coeficiente de correlación $r = 0,991$), confirmando que el procedimiento de análisis de la presente invención puede medir con precisión albúmina glicosilada.

5 Ejemplo 8

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

10 <Composición de la solución de reacción>

150 mM Varias soluciones tampón (pH 8,0)
 2.500 U/ml Proteasa de tipo XXIV (fabricada por Sigma-Aldrich Co.) o Pronasa (fabricado por Sigma-Aldrich Co.)
 10 U/ml Oxidasa de ácido ascórbico (ASO-311, fabricada por Toyobo Co., Ltd.) u oxidasa de ácido ascórbico del tipo termoestable (ASO-312, fabricada por Toyobo Co., Ltd.)

R-1 Como agente tampón en el reactivo proteolítico, se utilizaron ácido 3-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]propanosulfónico (EPPS), ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]etanosulfónico (HEPES), ácido 2-hidroxi-3-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]propanosulfónico (HEPPSO), trishidroximetilaminometano (Tris), ácido piperazina-1,4-bis(2-hidroxi-3-propanosulfónico) (POPSO) (los compuestos anteriores: fabricados por Dojindo Laboratories) y ácido fosfórico (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

20 <Procedimiento>

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

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

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

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

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

Ejemplo 9

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

<Composición de la solución de reacción>

50 Reactivo proteolítico R-1

150 mM Varias soluciones tampón Tris (pH 8,0)

ES 2 596 880 T3

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

Reactivo de análisis de aminoácidos glicosilados R-2

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

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

<Solución de sustrato de control y solución de sustrato de adición de ácido ascórbico >

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

<Procedimiento de reacción>

- 15 Se añadieron 8 µl de la solución de sustrato de control o de solución de sustrato de adición de ácido ascórbico a 240 µl de R-1 incubado a 37°C. La reacción se inició a 37°C, y exactamente 5 minutos después se añadieron 80 µl de R-2. Se midió la absorbancia a 555 nm antes de la adición de R-2 y cinco minutos después de la adición de R-2. Se calculó ΔA_0 restando el cambio de absorbancia obtenido de una muestra en blanco, utilizando agua destilada en lugar de la solución de sustrato, del cambio de absorbancia obtenido de la medición de absorbancia en la solución de sustrato de control y la solución de sustrato de adición de ácido ascórbico. La misma solución de reacción R-1 se almacenó a temperatura ambiente durante 24 horas, y se midió la absorbancia de la misma manera para calcular ΔA_{24} . Se calculó la proporción de ΔA_0 y ΔA_{24} obtenida de la solución de sustrato de adición de ácido ascórbico, suponiendo que el cambio de absorbancia obtenido en la solución de sustrato de control es 100. Los resultados se muestran en la figura 4.

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

- 40 Además, los resultados anteriores demuestran claramente que la presente invención es útil para el análisis de albúmina glicosilada, fructosamina y hemoglobina glicosilada.

Ejemplo 10

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

<Composición de la solución de reacción>

- 50 Reactivo de pretratamiento R-1

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

Reactivo de coloración de albúmina R-2

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

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

- 5 1) Ácido 6,6'-ditiopicotínico: 100 mM
- 2) Ácido 3,3'-ditiopropiónico: 100 mM
- 3) Ácido 2,2'-ditiobenzóico: 100 mM
- 4) 4,4'-ditiomorfolino: 100 mM
- 5) DTNB (50 mM)
- 10 6) DDD (33 mM)
- 7) 2-PDS (25 mM)
- 8) 4-PDS (50 mM)
- 9) SDS (0,3%)
- 15 1) - 5) fabricados por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
- 6) - 9) fabricados por Dojindo Laboratories

<Muestras>

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

25 <Procedimiento de reacción>

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

35 Tabla 5

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

Tabla 5 (continuación)

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

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

Ejemplo 11

<Estabilización de la proteasa>

5

<Composición de la solución de reacción>

Reactivo proteolítico R-1

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

10

Reactivo de análisis de aminoácidos glicosilados R-2

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

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

15

- 1) 0,5 mM Cloruro de magnesio
- 2) 10 mM Cloruro de calcio
- 3) 100 mM Cloruro de sodio
- 4) 0,1% Etilenglicol (EtGly)
- 5) 10% Dimetilsulfóxido (DMSO)
- 6) 1% Etanol (EtOH)
- 7) 0,1% Trietanolamina lauril sulfato (TEALS)

20

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

25

<Muestra>

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

<Procedimiento de reacción>

30

Se añadieron 8 µl de una muestra a 240 µl del reactivo proteolítico incubado a 37°C. La reacción se inició a 37°C y, exactamente 5 minutos después, se añadieron 80 µl del reactivo de análisis de aminoácidos glicosilados. Se midió la absorbancia a 546 nm antes de la adición del reactivo de análisis de aminoácidos glicosilados y cinco minutos después de la adición del reactivo de análisis de aminoácidos glicosilados. Se calculó ΔA_0 restando el cambio de absorbancia obtenido de una muestra en blanco, utilizando agua destilada en lugar de la solución de sustrato, del cambio de absorbancia obtenido de la medición de absorbancia en la solución de sustrato. La misma solución de reacción de reactivo proteolítico se almacenó a 37°C durante 24 horas, y se midió la absorbancia de la misma manera. Se calculó ΔA_{24} basándose en los resultados de la medición de absorbancia. Se calculó la sensibilidad relativa para el experimento utilizando el reactivo que contiene un estabilizador con respecto al experimento que utiliza el reactivo que no contiene estabilizador, suponiendo que ΔA_0 , obtenido utilizando el reactivo que no contiene estabilizador y utilizado sin almacenamiento, es de 100%. Los resultados se muestran en la figura 5.

35

40

45

50

Tal como se puede observar en la figura 5, la sensibilidad relativa disminuyó a 60% cuando no se utilizó un estabilizador, lo que indica el efecto de estabilización del reactivo proteolítico. En el experimento en el que se añadió un estabilizador, se observó el efecto de estabilización por la adición de cloruro de calcio, cloruro de sodio, DMSO, EtOH o TEALS. De estos, cloruro de calcio y DMSO no mostraron casi ninguna disminución en el rendimiento. Se continuó el experimento de estabilidad utilizando DMSO y cloruro de calcio, para encontrar que casi no se observó disminución en el rendimiento durante el almacenamiento durante 4 semanas a 37°C. Además, se confirmó que estos compuestos tienen un efecto de estabilidad en el almacenamiento durante un año o más, cuando se almacena en estado líquido en un refrigerador.

Ejemplo 12

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

5 <Composición de la solución de reacción>

Reactivo proteolítico R-1

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

10 Reactivo R-2 de análisis de aminoácidos glicosilados

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

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

15

1) 5% Manitol
2) 5% Sorbitol
3) 5% Sacarosa
4) 5% Trehalosa
20 5) 0,5 mM Cloruro de calcio
6) 0,5 mM Cloruro de magnesio
7) 3% Ácido L-glutámico (Glu)
8) 3% L-glutamina (Gln)
9) 3% L-prolina (Pro)
25 10) 3% L-alanina (Ala)
11) 3% L-valina (Val)
12) 3% Glicina (Gly)
13) 3% L-lisina (Lys)
14) 3% Sarcosina
30 15) 100 mM Sulfato de amonio

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

<Muestra>

35

FZL 0,5 mM

<Procedimiento de reacción>

40 Se añadieron 8 μ l de una muestra a 240 μ l del reactivo proteolítico incubado a 37°C. La reacción se inició a 37°C y, exactamente cinco minutos después, se añadieron 80 μ l del reactivo de análisis de aminoácidos glicosilados. Se midió la absorbancia a 546 nm antes de la adición del reactivo de análisis de aminoácidos glicosilados y cinco minutos después de la adición del reactivo de análisis de aminoácidos glicosilados. Se calculó ΔA_0 restando el cambio de absorbancia obtenido de una muestra blanco, utilizando agua destilada en lugar de la solución de sustrato, del cambio de absorbancia obtenido de la medición de absorbancia en la solución de sustrato. La misma solución de reacción de reactivo de análisis de aminoácidos glicosilados se almacenó a 37°C durante dos días, y se midió la absorbancia de la misma manera. Se calculó ΔA_{24} basándose en los resultados de la medición de absorbancia. Se calculó la sensibilidad relativa para el experimento utilizando el reactivo que contiene un estabilizador con respecto al experimento que utiliza el reactivo que no contiene estabilizador, suponiendo que ΔA_0 , obtenido utilizando el reactivo que no contiene estabilizador y utilizado sin almacenamiento, es de 100%. Los resultados se muestran en la figura 6.

55 Tal como se puede observar en la figura 6, la sensibilidad relativa disminuyó al 30% cuando no se utilizó estabilizador, lo que indica el efecto de estabilización del reactivo de análisis de aminoácidos glicosilados. En el experimento en el que se añadió un estabilizador, se observó el efecto de estabilización por la adición de manitol, sorbitol, sacarosa, trehalosa, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, ácido L-glutámico, L-glutamina, L-prolina, L-alanina, L-valina, glicina, L-lisina, sarcosina y sulfato de amonio. De estos, los alcoholes de azúcares, aminoácidos y sarcosina mostraron un efecto de estabilización particularmente fuerte. Se continuó el experimento de estabilidad utilizando L-alanina, glicina o sarcosina para encontrar que casi no se observó disminución en el rendimiento durante

el almacenamiento por cuatro semanas a 37°C. Además, se confirmó que estos compuestos tienen un efecto de estabilidad en almacenamiento de uno o más años, cuando se almacenan en estado líquido en un refrigerador.

Ejemplo 13

5

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

La síntesis de un oligonucleótido que tiene la secuencia de bases de 1-30 en la secuencia de bases del listado de secuencias SEQ ID NO: 5 y un oligonucleótido que tiene la secuencia de bases de 1-30 en la secuencia de bases del listado de secuencias SEQ ID NO: 5 fueron consignadas a BEX Co., Ltd. Se realizó una PCR utilizando un kit de Taq polimerasa (fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd.), utilizando ADN que codifica la proteína FOD obtenida de *Fusarium oxysporum* IFO-9972 como plantilla, según el manual adjunto al kit, amplificando así el gen estructural FOD.

La reacción se llevó a cabo con la adición de iones de Mg⁺⁺ equivalentes hasta la concentración final de 0,5 mM a la solución de reacción y a concentraciones de base distribuidas no uniforme de dATP: 0,51 mM, dCTP: 0,20 mM, dGTP: 1,15 mM y dTTP : 3,76 mM para promover la eficiencia de la mutagénesis.

Ejemplo 14

20

<Preparación de biblioteca recombinante de FOD mutante>

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

Ejemplo 15

30

<Cribado de FOD mutada específicamente en lisina>

Las colonias de la biblioteca preparada en el Ejemplo 14 se replicaron en dos láminas de medio de cultivo en placa con agar LB, cada una de las cuales contenía 100 µg/ml de ampicilina e IPTG 1 mM (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Un medio de cultivo de agar LB (0,3%) que contenía 5 U/ml de peroxidasa (fabricada por Asahi Kasei Corporation), ortodanisidina al 0,02% (fabricada por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), valina glicosilada o lisina glicosilada 2,0 mM (preparadas por el procedimiento de Hashiba y otros. Hashiba, H. (1976) J. Agric. Food Chem., 24, 70) se estratificó sobre cada medio. Después de incubar a 37°C durante ocho horas, se observaron radicales de oxígeno formados por la oxidación de aminoácido glicosilado con FOD y la coloración de las colonias producida por la dianisidina. Se cribaron de esta manera las colonias teñidas de púrpura oscuro con lisina glicosilada y no teñidas con valina glicosilada y se obtuvieron 164 cepas de las colonias correspondientes.

Ejemplo 16

45

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

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

Ejemplo 17

55

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

Se midió la especificidad de sustrato de aminoácidos glicosilados de la FOD mutada recombinante contenida en el extracto celular preparado en el Ejemplo 16, utilizando el procedimiento de medición de actividad enzimática de FOD mencionado anteriormente. Como resultado, entre las cepas candidatas se identificaron dos mutantes en los que la reactividad con valina glicosilada es menor de 1/1.000 de la reactividad con lisina glicosilada. Estos se consideraron como los mutantes objetivo.

60

Ejemplo 18

<Extracción de plásmido recombinante>

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

Ejemplo 19

10

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

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

Ejemplo 20

20

<Confirmación de la especificidad de sustrato de cada mutante>

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

35

Tabla 6

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

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

45

Ejemplo 21

<Análisis de fructosil-L-valina (FV) después de eliminar ϵ -fructosil-L-lisina (ZFL) en una muestra >

5 Reactivo de reacción 1

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

Reactivo de reacción 2

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

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

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

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

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

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

30 Ejemplo 22

<Determinación de la proporción de albúmina glicosilada>

35 Reactivo proteolítico R-1

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

Reactivo de análisis de aminoácidos glicosilados R-2

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

40 Reactivo de pretratamiento de albúmina R-3

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

Reactivo de coloración de albúmina R-4

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

<Muestra>

5

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

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

<Procedimiento de reacción>

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

20

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

25

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

30

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

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

35

Tal como puede observarse en la figura 9, el procedimiento enzimático y procedimiento HPLC mostraron una excelente correlación de $r = 0,998$. Ninguno de estos reactivos mostró ningún cambio en el comportamiento después de almacenado en estado líquido durante dos semanas a 37°C. En base a estos experimentos, se ha demostrado evidentemente que los reactivos determinan con precisión albúmina glicosilada y determinan la proporción de albúmina glicosilada al

40

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

45

Ejemplo 23

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

50

R-1

200 mM Solución tampón POPSO (pH 7,5)
 5 mM 4-aminoantipirina
 10 U/ml POD
 20 U/ml R-FOD
 5 U/ml Oxidasa de ácido ascórbico
 3% Ácido glutámico

R-2

55

20 mM Solución tampón de ácido piperazina-1,4-bis(2-etanosulfónico)(pH 6,5)
 20% DMSO

8.000 U/ml Proteasa tipo XXIV
 4% Ácido sulfúrico-3-[(colamidopropil)-dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propano
 5 mM TODB

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

<Muestra>

5

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

<Procedimiento de reacción>

10

El mismo que en el Ejemplo 22.

Los resultados se muestran en la figura 23.

15

Tal como puede observarse en la figura 23, las proteínas glicosiladas se analizaron de forma excelente en un tiempo de reacción corto de 10 minutos, incluso en el caso en que se añade una enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado al primer reactivo y se añade una proteasa al segundo reactivo. Además, incluso si está presente un aminoácido glicosilado en una muestra, el aminoácido glicosilado en la muestra se puede eliminar mediante la enzima que reacciona, como mínimo, con el aminoácido glicosilado formulado en R-1, permitiendo de esta manera que las proteínas glicosiladas sean analizadas con precisión.

20

El reactivo de la presente invención mostró una buena correlación ($R=0,99$) con el procedimiento de HPLC de:

Procedimiento enzimático GA (%) = $1,03 \times$ procedimiento de HPLC GA (%) - 0,3

confirmando un análisis preciso de proteínas glicosiladas. No hubo ninguna disminución en el comportamiento del reactivo de la presente invención después de almacenado durante tres semanas a 37°C o durante 15 meses en un refrigerador.

25

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

30

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

COMENTARIOS SOBRE EL MATERIAL BIOLÓGICO DEPOSITADO

35

(1) (a) Nombre y dirección de la organización en la que se depositaron los materiales biológicos:

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

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

40

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

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

(2) (a) Nombre y dirección de la organización en la que se depositaron los materiales biológicos:

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

45

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

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

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

Realizaciones preferidas:

50

1. Una composición para el análisis de proteínas glicosiladas utilizando una proteasa y una enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado, caracterizado porque la proteasa está presente junto con

1) como mínimo, uno seleccionado del grupo que comprende ácido desoxicólico, amida de ácido desoxicólico, amida de ácido cólico, octil glucósido, sal de amonio cuaternario, un surfactante catiónico del tipo sal de amonio cuaternario, concanavalina A, y betaína, y/o

55

2) oxidasa de ácido ascórbico y un agente tampón que no tiene un grupo 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinilo.

2. La composición, según la realización 1, en la que la amida de ácido desoxicólico es bisgluconamidopropildesoxicolamida y la amida de ácido cólico es ácido 3-[(colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propano sulfúrico, ácido 3-[(colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propano sulfúrico o bisgluconamidopropilcolamida.

60

3. La composición, según la realización 1, en la el agente tampón que no tiene un grupo 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinilo es trishidroxietilaminometano o ácido piperazina-1,4-bis(2-hidroxi-3-propanosulfónico).
- 5 4. La composición, según cualquiera de las realizaciones 1 a 3, en la que la proteína glicosilada es albúmina glicosilada, la composición incluye, por separado, una composición para analizar albúmina y la composición determina la proporción de glicosilación de la albúmina, en la que la composición para analizar albúmina comprende un agente desnaturizante de proteínas y / o un compuesto que tiene un enlace S-S y púrpura de bromocresol.
- 10 5. Una composición para analizar albúmina glicosilada mediante una proteasa y una enzima que reacciona, como mínimo, un aminoácido glicosilado, y medir por separado la albúmina y determinar la proporción de glicosilación de la albúmina, caracterizado porque la composición para el análisis de albúmina comprende un agente desnaturizante de proteínas y/o un compuesto que tiene un enlace S-S y púrpura de bromocresol.
- 15 6. La composición, según la realización 4 ó 5, en la que el agente desnaturizante de proteínas y / o el compuesto que tiene un enlace S-S es ácido 2,2'-ditiobenzóico, ácido 4,4'-ditiomorfolino, disulfuro de 2,2'- dihidroxi-6,6'- dinaftilo (DDD), 2,2'-ditiopiridina (2-PDS), 4,4'-ditiopiridina (4-PDS), ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) o laurilsulfato de sodio.
- 20 7. La composición, según cualquiera de las realizaciones 1 - 6, en la que un estabilizador de proteasa seleccionada del grupo que consiste en dimetilsulfóxido, alcohol, sal de calcio soluble en agua, cloruro de sodio, sal de amonio cuaternario y surfactante catiónico de tipo sal de amonio cuaternario se añade a la proteasa.
- 25 8. Una composición para el análisis de proteínas glicosiladas, que comprende una proteasa, una enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado y un estabilizador de la proteasa seleccionado del grupo que comprende dimetilsulfóxido, alcohol, sal de calcio soluble en agua, cloruro de sodio, sal de amonio cuaternario y surfactante catiónico de tipo sal de amonio cuaternario.
- 30 9. La composición, según cualquiera de las realizaciones 1 - 8, en la que un estabilizador para la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado seleccionado del grupo que comprende alcohol de azúcar, sacarosa, sal de magnesio soluble en agua, sal de calcio soluble en agua, sulfato de amonio, aminoácido y sarcosina se añade a la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado.
- 35 10. Una composición para analizar proteínas glicosiladas, que comprende una proteasa, una enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado, un estabilizador para la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado seleccionado del grupo que comprende alcohol de azúcar, sacarosa, sal de magnesio soluble en agua, sal de calcio soluble en agua, sulfato de amonio, aminoácido y sarcosina.
- 40 11. La composición, según cualquiera de las realizaciones 1 - 10, en la que la proteasa procede de un microorganismo que pertenece al género Bacillus.
- 45 12. La composición, según cualquiera de las realizaciones 1 - 11, en la que la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado es una oxidasa de fructosil aminoácido mutante de la cual la reactividad con valina glicosilada se ha reducido de manera significativa por la sustitución de la lisina 372 en la secuencia de aminoácidos en la tabla de secuencia, secuencia ID N° 1, con otro aminoácido.
- 50 13. La composición, según la realización 12, en la que se utiliza la oxidasa de fructosil aminoácido sustituida con triptófano, metionina o valina como otro aminoácido.
- 55 14. La composición, según cualquiera de las realizaciones 1-13, en la que la composición es un producto líquido.
- 60 15. Una composición para analizar proteínas glicosiladas que comprende una proteasa, una enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado, en la que la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado está contenida en un primer reactivo y la proteasa está contenida en un segundo reactivo.
- 65 16. La composición, según la realización 15, en la que la composición es un producto líquido.
17. Una oxidasa de fructosil aminoácido mutante cuya reactividad con la valina glicosilada se ha reducido significativamente sustituyendo la lisina 372 en la secuencia de aminoácidos indicada en la Secuencia ID NO: 1 por otro aminoácido.
18. La oxidasa de fructosil aminoácido mutante, según la realización 17, en la que el otro aminoácido es triptófano, metionina o valina.
19. Un procedimiento para el análisis de proteínas glicosiladas utilizando una proteasa y una enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado, caracterizado porque la proteasa se hace reaccionar
1) en presencia de, como mínimo, un miembro seleccionado del grupo que comprende ácido desoxicólico, amida de

- ácido desoxicólico, amida de ácido cólico, sal de amonio cuaternario, un surfactante catiónico del tipo sal de amonio cuaternario, concanavalina A, octil glucósido y betaína, para disminuir la reactividad de la proteasa con los componentes de globulinas y/o
- 5 2) una oxidasa de ácido ascórbico se hace reaccionar en un agente de tampón que no tiene un grupo 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinilo, para eliminar el ácido ascórbico y, de forma simultánea, digerir proteínas.
20. El procedimiento, según la realización 19, en el que la amida de ácido desoxicólico es bisgluconamidopropildesoxicolamida y la amida de ácido cólico es ácido 3-[(colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propano sulfúrico, ácido 3-[(colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propano sulfúrico o
- 10 bisgluconamidopropilcolamida.
21. El procedimiento, según la realización 19, en el que el agente tampón que no tiene un grupo 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinilo es trishidroxi-etilaminometano o ácido piperazina-1,4-bis(2-hidroxi-3-propanosulfónico).
- 15 22. El procedimiento, según cualquiera de las realizaciones 19 - 21, en el que la proteína glicosilada es albúmina y la albúmina se analiza por separado, para calcular la proporción de glicosilación de la albúmina, y la albúmina se analiza mediante tratamiento previo de una solución de muestra con un agente de desnaturalización de proteínas y/o un compuesto que tiene un enlace S-S y, de forma simultánea o posteriormente, utilizando púrpura de bromocresol.
- 20 23. Un procedimiento para calcular la proporción de albúmina glicosilada mediante digestión de la albúmina haciendo reaccionar una proteasa con una solución de la muestra, analizando la albúmina glicosilada utilizando una enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado y dividiendo el valor determinado por la cantidad de albúmina determinada por separado usando púrpura de bromocresol, que comprende el tratamiento previo de la muestra con un agente de desnaturalización de proteínas y/o un compuesto que tiene un enlace S-S y el
- 25 análisis de la albúmina al mismo tiempo o de forma sucesiva.
24. El procedimiento, según la realización 22 ó 23, en el que el agente desnaturalizante de proteínas y / o el compuesto que tiene un enlace S-S es ácido 2,2'-ditiodibenzoico, ácido 4,4'-ditiodimorfolino, disulfuro de 2,2'-dihidroxi-6,6'-dinaftilo (DDD), 2,2'-ditiopiridina (2-PDS), 4,4'-ditiopiridina (4-PDS), ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) o laurilsulfato de sodio.
- 30 25. El procedimiento, según cualquiera de las realizaciones 19 - 23, en el que un estabilizador de proteasa seleccionada del grupo que consiste en dimetilsulfóxido, alcohol, sal de calcio soluble en agua, cloruro de sodio, sal de amonio cuaternario y surfactante catiónico de tipo sal de amonio cuaternario se añade a la proteasa.
- 35 26. Un procedimiento para el análisis de proteínas glicosiladas utilizando una proteasa y una enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado, caracterizado porque un estabilizador de la proteasa seleccionado del grupo que comprende dimetilsulfóxido, alcohol, sal de calcio soluble en agua, cloruro de sodio, sal de amonio cuaternario y surfactante catiónico de tipo sal de amonio cuaternario se añade a la proteasa.
- 40 27. El procedimiento, según cualquiera de las realizaciones 19 - 26, en el que un estabilizador para la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado seleccionado del grupo que comprende alcohol de azúcar, sacarosa, sal de magnesio soluble en agua, sal de calcio soluble en agua, sulfato de amonio, aminoácido y sarcosina se añade a la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado.
- 45 28. Un procedimiento para analizar proteínas glicosiladas utilizando una proteasa y una enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado, que comprende añadir un estabilizador para la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado seleccionado del grupo que comprende alcohol de azúcar, sacarosa, sal de magnesio soluble en agua, sal de calcio soluble en agua, sulfato de amonio, aminoácido y sarcosina a la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado.
- 50 29. El procedimiento, según cualquiera de las realizaciones 19 - 28, en el que la proteasa procede de un microorganismo que pertenece al género Bacillus.
- 55 30. El procedimiento, según cualquiera de las realizaciones 19 - 29, en el que la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado es una oxidasa de fructosil aminoácido mutante de la cual la reactividad con valina glicosilada se ha reducido de manera significativa por la sustitución de la lisina 372 en la secuencia de aminoácidos en la tabla de secuencia, secuencia ID N^o 1, con otro aminoácido.
- 60 31. El procedimiento, según la realización 30, en el que se utiliza la oxidasa de fructosil aminoácido sustituida con triptófano, metionina o valina como otro aminoácido.
32. El procedimiento, según cualquiera de las realizaciones 19-31, en el que la composición es un producto líquido.
- 65 33. El procedimiento, según la realización 32, en el que las proteínas glicosiladas se analizan mediante la reacción de la muestra con la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado y, después, con la

proteasa.

- 5 34. Un procedimiento para el análisis de proteínas glicosiladas utilizando una proteasa y una enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado, que comprende hacer reaccionar la muestra con la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado y, después, con la proteasa.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Yoshioka, Issei; Asahi Kasei Co., Ltd
 <120> Composición para analizar proteínas glicosiladas
 10 <130>
- <150> JP 2001/22953
 <151> 13-01-2001
- 15 <150> JP 2001/39796
 <151> 16-02-2001
- <150> JP 2001/24002
 <151> 08-08-2001
 20
- <160> 11
 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 <211> 1320
 25 <212> ADN
 <213> *Fusarium oxysporum* fsp. *raphani*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)... (1320)
 30 <223> Gen de la oxidasa de fructosilamina
- <300>
 <308> DDBJ E16562
 <309> 28-27-1999
 35 <310> JP 1998201473-A/1
 <311> 20-01-1997
 <312> 04-08-1998
 <400> 1

gcc tca act ctc acc aaa cag tcc caa att ctc atc gtt ggt ggc gga 48
 Ala Ser Thr Leu Thr Lys Gln Ser Gln Ile Leu Ile Val Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 act tgg gga tgc tca act gcc ctc cat ctc gcc cgt cgg ggt tac acc 96
 Thr Trp Gly Cys Ser Thr Ala Leu His Leu Ala Arg Arg Gly Tyr Thr
 20 25 30
 aac gtc act gtt ctc gat gtc aat cgc atc ccg tca ccg ata tca gcc 144
 Asn Val Thr Val Leu Asp Val Asn Arg Ile Pro Ser Pro Ile Ser Ala
 35 40 45
 ggg cat gat gta aac aaa ctt gct ggc cga ctg tcg act gcc gat agc 192
 Gly His Asp Val Asn Lys Leu Ala Gly Arg Leu Ser Thr Ala Asp Ser
 50 55 60
 aaa ggt gat gat gaa gac tca atc tgg aaa gca ctt agc tac gcc gca 240
 Lys Gly Asp Asp Glu Asp Ser Ile Trp Lys Ala Leu Ser Tyr Ala Ala
 65 70 75 80
 gct caa gga tgg ctc cac gac cct gtc ttc caa cca ttc tgc cac aat 288
 Ala Gln Gly Trp Leu His Asp Pro Val Phe Gln Pro Phe Cys His Asn
 85 90 95
 aca ggc tct gtc gtg gct ggc tca aca cca aag tct atc aag cag ctg 336
 Thr Gly Ser Val Val Ala Gly Ser Thr Pro Lys Ser Ile Lys Gln Leu
 100 105 110
 gta gaa gat gag atc ggt gac gac atc gac cag tat aca cct ctc aac 384
 Val Glu Asp Glu Ile Gly Asp Asp Ile Asp Gln Tyr Thr Pro Leu Asn
 115 120 125
 aca gca gaa gat ttc aga aag acc atg cct gag ggt atc ctg aca ggt 432
 Thr Ala Glu Asp Phe Arg Lys Thr Met Pro Glu Gly Ile Leu Thr Gly
 130 135 140

aac ttt cca ggc tgg aag ggc ttt tac aag ccc acg ggt tct ggt tgg 480
Asn Phe Pro Gly Trp Lys Gly Phe Tyr Lys Pro Thr Gly Ser Gly Trp
145 150 155 160
gtt cat gct cga aaa gct atg aaa gct gct ttc gaa gag agc gag agg 528
Val His Ala Arg Lys Ala Met Lys Ala Ala Phe Glu Glu Ser Glu Arg
165 170 175
ctt ggt gtc aaa ttc atc act ggc tct ccc gaa gga aag gtg gag agt 576
Leu Gly Val Lys Phe Ile Thr Gly Ser Pro Glu Gly Lys Val Glu Ser
180 185 190
ctg atc ttt gaa gac ggc gat gtt cga ggt gcc aag acg gca gat ggt 624
Leu Ile Phe Glu Asp Gly Asp Val Arg Gly Ala Lys Thr Ala Asp Gly
195 200 205
aag gag cac aga gcg gat cga act att ctt tcc gct ggt gct tca gca 672
Lys Glu His Arg Ala Asp Arg Thr Ile Leu Ser Ala Gly Ala Ser Ala
210 215 220
gag ttc ttc ctc gat ttt gag aac cag atc cag cct acg gcg tgg acc 720
Glu Phe Phe Leu Asp Phe Glu Asn Gln Ile Gln Pro Thr Ala Trp Thr
225 230 235 240
ctg ggc cat atc cag atg aca cca gaa gaa acc aag ctg tac aag aac 768
Leu Gly His Ile Gln Ile Thr Pro Glu Glu Thr Lys Leu Tyr Lys Asn
245 250 255
ctg cca cct ctt ttc aac atc aac caa ggt ttc ttc atg gaa cct gat 816
Leu Pro Pro Leu Phe Asn Ile Asn Gln Gly Phe Phe Met Glu Pro Asp
260 265 270
gag gat ctt cat caa ctc aag atg tgc gat gaa cat ccg ggc tac tgc 864
Glu Asp Leu His Gln Leu Lys Met Cys Asp Glu His Pro Gly Tyr Cys
275 280 285
aac tgg gtt gaa aag cct ggt tct aag tac ccc cag tcc atc ccc ttc 912
Asn Trp Val Glu Lys Pro Gly Ser Lys Tyr Pro Gln Ser Ile Pro Phe
290 295 300
gca aag cat caa gtg cca acc gag gct gaa cga cgc atg aag cag ttt 960

Ala Lys His Gln Val Pro Thr Glu Ala Glu Arg Arg Met Lys Gln Phe
 305 310 315 320
 ctg aaa gat atc atg cct cag ctt gca gat cgg ccg ctt gtt cat gct 1008
 Leu Lys Asp Ile Met Pro Gln Leu Ala Asp Arg Pro Leu Val His Ala
 325 330 335
 cga atc tgc tgg tgc gct gat aca cag gat aga atg ttc ctg atc acc 1056
 Arg Ile Cys Trp Cys Ala Asp Thr Gln Asp Arg Met Phe Leu Ile Thr
 340 345 350
 tat cat cct cga cat ccc tca ctt gtc att gct tca ggt gat tgc ggc 1104
 Tyr His Pro Arg His Pro Ser Leu Val Ile Ala Ser Gly Asp Cys Gly
 355 360 365
 acg ggt tac aag cat atc aca tca att gga aag ttc atc tct gac tgt 1152
 Thr Gly Tyr Lys His Ile Thr Ser Ile Gly Lys Phe Ile Ser Asp Cys
 370 375 380
 atg gag ggt acg ctt gag gaa agg ttt gcc aag ttc tgg aga tgg cga 1200
 Met Glu Gly Thr Leu Glu Glu Arg Phe Ala Lys Tyr Trp Arg Trp Arg
 385 390 395 400
 cca gag aag ttt acc gag ttc tgg ggt aaa gat cct ctg gat cgg ttt 1248
 Pro Glu Lys Phe Thr Glu Phe Trp Gly Lys Asp Pro Leu Asp Arg Phe
 405 410 415
 gga gct gac gat aag atc atg gat ttg ccc aag agt gat gta gag gga 1296
 Gly Ala Asp Asp Lys Ile Met Asp Leu Pro Lys Ser Asp Val Glu Gly
 420 425 430
 tgg aca aat atc aag aat gat atc 1320
 Trp Thr Asn Ile Lys Asn Asp Ile
 435 440

<210> 2

<211> 1320

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> CDS

Thr Gly Ser Val Val Ala Gly Ser Thr Pro Lys Ser Ile Lys Gln Leu	
100	105
110	
gta gaa gat gag atc ggt gac gac atc gac cag tat aca cct ctc aac	384
Val Glu Asp Glu Ile Gly Asp Asp Ile Asp Gln Tyr Thr Pro Leu Asn	
115	120
125	
aca gca gaa gat ttc aga aag acc atg cct gag ggt atc ctg aca ggt	432
Thr Ala Glu Asp Phe Arg Lys Thr Met Pro Glu Gly Ile Leu Thr Gly	
130	135
140	
aac ttt cca ggc tgg aag ggc ttt tac aag ccc acg ggt tct ggt tgg	480
Asn Phe Pro Gly Trp Lys Gly Phe Tyr Lys Pro Thr Gly Ser Gly Trp	
145	150
155	160
gtt cat gct cga aaa gct atg aaa gct gct ttc gaa gag agc gag agg	528
Val His Ala Arg Lys Ala Met Lys Ala Ala Phe Glu Glu Ser Glu Arg	
165	170
175	
ctt ggt gtc aaa ttc atc act ggc tct ccc gaa gga aag gtg gag agt	576
Leu Gly Val Lys Phe Ile Thr Gly Ser Pro Glu Gly Lys Val Glu Ser	
180	185
190	
ctg atc ttt gaa gac ggc gat gtt cga ggt gcc aag acg gca gat ggt	624
Leu Ile Phe Glu Asp Gly Asp Val Arg Gly Ala Lys Thr Ala Asp Gly	
195	200
205	
aag gag cac aga gcg gat cga act att ctt tcc gct ggt gct tca gca	672
Lys Glu His Arg Ala Asp Arg Thr Ile Leu Ser Ala Gly Ala Ser Ala	
210	215
220	
gag ttc ttc ctc gat ttt gag aac cag atc cag cct acg gcg tgg acc	720
Glu Phe Phe Leu Asp Phe Glu Asn Gln Ile Gln Pro Thr Ala Trp Thr	
225	230
235	240
ctg ggc cat atc cag atg aca cca gaa gaa acc aag ctg tac aag aac	768
Leu Gly His Ile Gln Ile Thr Pro Glu Glu Thr Lys Leu Tyr Lys Asn	
245	250
255	
ctg cca cct ctt ttc aac atc aac caa ggt ttc ttc atg gaa cct gat	816
Leu Pro Pro Leu Phe Asn Ile Asn Gln Gly Phe Phe Met Glu Pro Asp	

	260		265		270		
	gag gat ctt cat caa ctc aag atg tgc gat gaa cat ccg ggc tac tgc						864
	Glu Asp Leu His Gln Leu Lys Met Cys Asp Glu His Pro Gly Tyr Cys						
	275		280		285		
	aac tgg gtt gaa aag cct ggt tct aag tac ccc cag tcc atc ccc ttc						912
	Asn Trp Val Glu Lys Pro Gly Ser Lys Tyr Pro Gln Ser Ile Pro Phe						
	290		295		300		
	gca aag cat caa gtg cca acc gag gct gaa cga cgc atg aag cag ttt						960
	Ala Lys His Gln Val Pro Thr Glu Ala Glu Arg Arg Met Lys Gln Phe						
	305		310		315		320
	ctg aaa gat atc atg cct cag ctt gca gat cgg ccg ctt gtt cat gct						1008
	Leu Lys Asp Ile Met Pro Gln Leu Ala Asp Arg Pro Leu Val His Ala						
			325		330		335
	cga atc tgc tgg tgc gct gat aca cag gat aga atg ttc ctg atc acc						1056
	Arg Ile Cys Trp Cys Ala Asp Thr Gln Asp Arg Met Phe Leu Ile Thr						
			340		345		350
	tat cat cct cga cat ccc tca ctt gtc att gct tca ggt gat tgc ggc						1104
	Tyr His Pro Arg His Pro Ser Leu Val Ile Ala Ser Gly Asp Cys Gly						
			355		360		365
	acg ggt tac ttg cat atc aca tca att gga aag ttc atc tct gac tgt						1152
	Thr Gly Tyr Trp His Ile Thr Ser Ile Gly Lys Phe Ile Ser Asp Cys						
			370		375		380
	atg gag ggt acg ctt gag gaa agg ttt gcc aag ttc tgg aga tgg cga						1200
	Met Glu Gly Thr Leu Glu Glu Arg Phe Ala Lys Tyr Trp Arg Trp Arg						
			385		390		395
	cca gag aag ttt acc gag ttc tgg ggt aaa gat cct ctg gat cgg ttt						1248
	Pro Glu Lys Phe Thr Glu Phe Trp Gly Lys Asp Pro Leu Asp Arg Phe						
			405		410		415
	gga gct gac gat aag atc atg gat ttg ccc aag agt gat gta gag gga						1296
	Gly Ala Asp Asp Lys Ile Met Asp Leu Pro Lys Ser Asp Val Glu Gly						
			420		425		430

tgg aca aat atc aag aat gat atc 1320
 Trp Thr Asn Ile Lys Asn Asp Ile
 435 440

<210> 3
 <211> 1320
 <212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1320)

10 <223> Gen de oxidasa de fructosilamina mutado

<220>
 <221> mutación
 <222> (1115)

15 <223> "a" a "t"

<400> 3
 gcc tca act ctc aac aaa cag tcc caa att ctc atc gtt ggt ggc gga 48
 Ala Ser Thr Leu Thr Lys Gln Ser Gln Ile Leu Ile Val Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 act tgg gga tgc tca act gcc ctc cat ctc gcc cgt cgg ggt tac acc 96
 Thr Trp Gly Cys Ser Thr Ala Leu His Leu Ala Arg Arg Gly Tyr Thr
 20 25 30
 aac gtc act gtt ctc gat gtc aat cgc atc ccg tca ccg ata tca gcc 144
 Asn Val Thr Val Leu Asp Val Asn Arg Ile Pro Ser Pro Ile Ser Ala
 35 40 45
 ggg cat gat gta aac aaa ctt gct ggc cga ctg tcg act gcc gat agc 192
 Gly His Asp Val Asn Lys Leu Ala Gly Arg Leu Ser Thr Ala Asp Ser

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

gag ttc ttc ctc gat ttt gag aac cag atc cag cct acg gcg tgg acc 720
 Glu Phe Phe Leu Asp Phe Glu Asn Gln Ile Gln Pro Thr Ala Trp Thr
 225 230 235 240
 ctg ggc cat atc cag atg aca cca gaa gaa acc aag ctg tac aag aac 768
 Leu Gly His Ile Gln Ile Thr Pro Glu Glu Thr Lys Leu Tyr Lys Asn
 245 250 255
 ctg cca cct ctt ttc aac atc aac caa ggt ttc ttc atg gaa cct gat 816
 Leu Pro Pro Leu Phe Asn Ile Asn Gln Gly Phe Phe Met Glu Pro Asp
 260 265 270
 gag gat ctt cat caa ctc aag atg tgc gat gaa cat ccg ggc tac tgc 864
 Glu Asp Leu His Gln Leu Lys Met Cys Asp Glu His Pro Gly Tyr Cys
 275 280 285
 aac tgg gtt gaa aag cct ggt tct aag tac ccc cag tcc atc ccc ttc 912
 Asn Trp Val Glu Lys Pro Gly Ser Lys Tyr Pro Gln Ser Ile Pro Phe
 290 295 300
 gca aag cat caa gtg cca acc gag gct gaa cga cgc atg aag cag ttt 960
 Ala Lys His Gln Val Pro Thr Glu Ala Glu Arg Arg Met Lys Gln Phe
 305 310 315 320
 ctg aaa gat atc atg cct cag ctt gca gat cgg ccg ctt gtt cat gct 1008
 Leu Lys Asp Ile Met Pro Gln Leu Ala Asp Arg Pro Leu Val His Ala
 325 330 335
 cga atc tgc tgg tgc gct gat aca cag gat aga atg ttc ctg atc acc 1056
 Arg Ile Cys Trp Cys Ala Asp Thr Gln Asp Arg Met Phe Leu Ile Thr
 340 345 350

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

<210> 4

<211> 1320

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> CDS

10 <222> (1) .. (1320)

<223> Gen de oxidasa de fructosilamina mutado

<220>

<221> mutación

15 <222> (1114) .. (1115)

<223> "aa" a "gt"

<400> 4

ES 2 596 880 T3

gcc tca act ctc acc aaa cag tcc caa att ctc atc gtt ggt ggc gga 48
Ala Ser Thr Leu Thr Lys Gln Ser Gln Ile Leu Ile Val Gly Gly Gly
1 5 10 15

act tgg gga tgc tca act gcc ctc cat ctc gcc cgt cgg ggt tac acc 96
 Thr Trp Gly Cys Ser Thr Ala Leu His Leu Ala Arg Arg Gly Tyr Thr
 20 25 30

aac gtc act gtt ctc gat gtc aat cgc atc ccg tca ccg ata tca gcc 144
 Asn Val Thr Val Leu Asp Val Asn Arg Ile Pro Ser Pro Ile Ser Ala
 35 40 45

ggg cat gat gta aac aaa ctt gct ggc cga ctg tcg act gcc gat agc 192
 Gly His Asp Val Asn Lys Leu Ala Gly Arg Leu Ser Thr Ala Asp Ser
 50 55 60

aaa ggt gat gat gaa gac tca atc tgg aaa gca ctt agc tac gcc gca 240
 Lys Gly Asp Asp Glu Asp Ser Ile Trp Lys Ala Leu Ser Tyr Ala Ala
 65 70 75 80

gct caa gga tgg ctc cac gac cct gtc ttc caa cca ttc tgc cac aat 288
 Ala Gln Gly Trp Leu His Asp Pro Val Phe Gln Pro Phe Cys His Asn
 85 90 95

aca ggc tct gtc gtg gct ggc tca aca cca aag tct atc aag cag ctg 336
 Thr Gly Ser Val Val Ala Gly Ser Thr Pro Lys Ser Ile Lys Gln Leu
 100 105 110

gta gaa gat gag atc ggt gac gac atc gac cag tat aca cct ctc aac 384
 Val Glu Asp Glu Ile Gly Asp Asp Ile Asp Gln Tyr Thr Pro Leu Asn
 115 120 125

aca gca gaa gat ttc aga aag acc atg cct gag ggt atc ctg aca ggt 432
 Thr Ala Glu Asp Phe Arg Lys Thr Met Pro Glu Gly Ile Leu Thr Gly
 130 135 140

aac ttt cca ggc tgg aag ggc ttt tac aag ccc acg ggt tct ggt tgg 480
 Asn Phe Pro Gly Trp Lys Gly Phe Tyr Lys Pro Thr Gly Ser Gly Trp
 145 150 155 160

gtt cat gct cga aaa gct atg aaa gct gct ttc gaa gag agc gag agg 528
 Val His Ala Arg Lys Ala Met Lys Ala Ala Phe Glu Glu Ser Glu Arg
 165 170 175

ctt ggt gtc aaa ttc atc act ggc tct ccc gaa gga aag gtg gag agt 576

Leu Gly Val Lys Phe Ile Thr Gly Ser Pro Glu Gly Lys Val Glu Ser	
180	185
ctg atc ttt gaa gac ggc gat gtt cga ggt gcc aag acg gca gat ggt	624
Leu Ile Phe Glu Asp Gly Asp Val Arg Gly Ala Lys Thr Ala Asp Gly	
195	200
aag gag cac aga gcg gat cga act att ctt tcc gct ggt gct tca gca	672
Lys Glu His Arg Ala Asp Arg Thr Ile Leu Ser Ala Gly Ala Ser Ala	
210	215
gag ttc ttc ctc gat ttt gag aac cag atc cag cct acg gcg tgg acc	720
Glu Phe Phe Leu Asp Phe Glu Asn Gln Ile Gln Pro Thr Ala Trp Thr	
225	230
ctg ggc cat atc cag atg aca cca gaa gaa acc aag ctg tac aag aac	768
Leu Gly His Ile Gln Ile Thr Pro Glu Glu Thr Lys Leu Tyr Lys Asn	
245	250
ctg cca cct ctt ttc aac atc aac caa ggt ttc ttc atg gaa cct gat	816
Leu Pro Pro Leu Phe Asn Ile Asn Gln Gly Phe Phe Met Glu Pro Asp	
260	265
gag gat ctt cat caa ctc aag atg tgc gat gaa cat ccg ggc tac tgc	864
Glu Asp Leu His Gln Leu Lys Met Cys Asp Glu His Pro Gly Tyr Cys	
275	280
aac tgg gtt gaa aag cct ggt tct aag tac ccc cag tcc atc ccc ttc	912
Asn Trp Val Glu Lys Pro Gly Ser Lys Tyr Pro Gln Ser Ile Pro Phe	
290	295
gca aag cat caa gtg cca acc gag gct gaa cga cgc atg aag cag ttt	960
Ala Lys His Gln Val Pro Thr Glu Ala Glu Arg Arg Met Lys Gln Phe	
305	310
ctg aaa gat atc atg cct cag ctt gca gat cgg ccg ctt gtt cat gct	1008
Leu Lys Asp Ile Met Pro Gln Leu Ala Asp Arg Pro Leu Val His Ala	
325	330
cga atc tgc tgg tgc gct gat aca cag gat aga atg ttc ctg atc acc	1056
Arg Ile Cys Trp Cys Ala Asp Thr Gln Asp Arg Met Phe Leu Ile Thr	

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

<210> 5

<211> 30

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

<400> 5

10 aaaacatgg cctcaactct caccaaacag

30

<210> 6

<211> 30

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

ES 2 596 880 T3

<400> 6

aaaaagaatt cagatatcat tcttgatatt 30

<210> 7

5 <211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (13)...(14)

<223> Cebador de mutagénesis dirigida a sitio

<400> 7

15 ggcacgggtt acnnsccatc cacatca 27

<210> 8

<211> 440

<212> PRT

<213> Fusarium oxysporum fsp. raphani

20

<220>

<223> Oxidasa de fructosilamina

<400> 8

25

Ala Ser Thr Leu Thr Lys Gln Ser Gln Ile Leu Ile Val Gly Gly Gly
1 5 10 15

Thr Trp Gly Cys Ser Thr Ala Leu His Leu Ala Arg Arg Gly Tyr Thr
20 25 30

Asn Val Thr Val Leu Asp Val Asn Arg Ile Pro Ser Pro Ile Ser Ala
35 40 45

Gly His Asp Val Asn Lys Leu Ala Gly Arg Leu Ser Thr Ala Asp Ser
50 55 60

ES 2 596 880 T3

Lys Gly Asp Asp Glu Asp Ser Ile Trp Lys Ala Leu Ser Tyr Ala Ala
 65 70 75 80
 Ala Gln Gly Trp Leu His Asp Pro Val Phe Gln Pro Phe Cys His Asn
 85 90 95
 Thr Gly Ser Val Val Ala Gly Ser Thr Pro Lys Ser Ile Lys Gln Leu
 100 105 110
 Val Glu Asp Glu Ile Gly Asp Asp Ile Asp Gln Tyr Thr Pro Leu Asn
 115 120 125
 Thr Ala Glu Asp Phe Arg Lys Thr Met Pro Glu Gly Ile Leu Thr Gly
 130 135 140
 Asn Phe Pro Gly Trp Lys Gly Phe Tyr Lys Pro Thr Gly Ser Gly Trp
 145 150 155 160
 Val His Ala Arg Lys Ala Met Lys Ala Ala Phe Glu Glu Ser Glu Arg
 165 170 175
 Leu Gly Val Lys Phe Ile Thr Gly Ser Pro Glu Gly Lys Val Glu Ser
 180 185 190
 Leu Ile Phe Glu Asp Gly Asp Val Arg Gly Ala Lys Thr Ala Asp Gly
 195 200 205
 Lys Glu His Arg Ala Asp Arg Thr Ile Leu Ser Ala Gly Ala Ser Ala
 210 215 220
 Glu Phe Phe Leu Asp Phe Glu Asn Gln Ile Gln Pro Thr Ala Trp Thr
 225 230 235 240
 Leu Gly His Ile Gln Met Thr Pro Glu Glu Thr Lys Leu Tyr Lys Asn
 245 250 255
 Leu Pro Pro Leu Phe Asn Ile Asn Gln Gly Phe Phe Met Glu Pro Asp
 260 265 270
 Glu Asp Leu His Gln Leu Lys Met Cys Asp Glu His Pro Gly Tyr Cys
 275 280 285
 Asn Trp Val Glu Lys Pro Gly Ser Lys Tyr Pro Gln Ser Ile Pro Phe
 290 295 300
 Ala Lys His Gln Val Pro Thr Glu Ala Glu Arg Arg Met Lys Gln Phe
 305 310 315 320
 Leu Lys Asp Ile Met Pro Gln Leu Ala Asp Arg Pro Leu Val His Ala
 325 330 335

ES 2 596 880 T3

Arg Ile Cys Trp Cys Ala Asp Thr Gln Asp Arg Met Phe Leu Ile Thr
 340 345 350
 Tyr His Pro Arg His Pro Ser Leu Val Ile Ala Ser Gly Asp Cys Gly
 355 360 365
 Thr Gly Tyr Lys His Ile Thr Ser Ile Gly Lys Phe Ile Ser Asp Cys
 370 375 380
 Met Glu Gly Thr Leu Glu Glu Arg Phe Ala Lys Phe Trp Arg Trp Arg
 385 390 395 400
 Pro Glu Lys Phe Thr Glu Phe Trp Gly Lys Asp Pro Leu Asp Arg Phe
 405 410 415
 Gly Ala Asp Asp Lys Ile Met Asp Leu Pro Lys Ser Asp Val Glu Gly
 420 425 430
 Trp Thr Asn Ile Lys Asn Asp Ile
 435 440

<210> 9

<211> 440

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> MUTÁGENO

<222> (372)

10 <223> Oxidasa de fructosilamina mutada Lys372 a Trp

<400> 9

Ala Ser Thr Leu Thr Lys Gln Ser Gln Ile Leu Ile Val Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Trp Gly Cys Ser Thr Ala Leu His Leu Ala Arg Arg Gly Tyr Thr
 20 25 30
 Asn Val Thr Val Leu Asp Val Asn Arg Ile Pro Ser Pro Ile Ser Ala
 35 40 45
 Gly His Asp Val Asn Lys Leu Ala Gly Arg Leu Ser Thr Ala Asp Ser
 50 55 60
 Lys Gly Asp Asp Glu Asp Ser Ile Trp Lys Ala Leu Ser Tyr Ala Ala
 65 70 75 80
 Ala Gln Gly Trp Leu His Asp Pro Val Phe Gln Pro Phe Cys His Asn
 85 90 95
 Thr Gly Ser Val Val Ala Gly Ser Thr Pro Lys Ser Ile Lys Gln Leu
 100 105 110

ES 2 596 880 T3

Val Glu Asp Glu Ile Gly Asp Asp Ile Asp Gln Tyr Thr Pro Leu Asn
 115 120 125
 Thr Ala Glu Asp Phe Arg Lys Thr Met Pro Glu Gly Ile Leu Thr Gly
 130 135 140
 Asn Phe Pro Gly Trp Lys Gly Phe Tyr Lys Pro Thr Gly Ser Gly Trp
 145 150 155 160
 Val His Ala Arg Lys Ala Met Lys Ala Ala Phe Glu Glu Ser Glu Arg
 165 170 175
 Leu Gly Val Lys Phe Ile Thr Gly Ser Pro Glu Gly Lys Val Glu Ser
 180 185 190
 Leu Ile Phe Glu Asp Gly Asp Val Arg Gly Ala Lys Thr Ala Asp Gly
 195 200 205
 Lys Glu His Arg Ala Asp Arg Thr Ile Leu Ser Ala Gly Ala Ser Ala
 210 215 220
 Glu Phe Phe Leu Asp Phe Glu Asn Gln Ile Gln Pro Thr Ala Trp Thr
 225 230 235 240
 Leu Gly His Ile Gln Met Thr Pro Glu Glu Thr Lys Leu Tyr Lys Asn
 245 250 255
 Leu Pro Pro Leu Phe Asn Ile Asn Gln Gly Phe Phe Met Glu Pro Asp
 260 265 270
 Glu Asp Leu His Gln Leu Lys Met Cys Asp Glu His Pro Gly Tyr Cys
 275 280 285
 Asn Trp Val Glu Lys Pro Gly Ser Lys Tyr Pro Gln Ser Ile Pro Phe
 290 295 300
 Ala Lys His Gln Val Pro Thr Glu Ala Glu Arg Arg Met Lys Gln Phe
 305 310 315 320
 Leu Lys Asp Ile Met Pro Gln Leu Ala Asp Arg Pro Leu Val His Ala
 325 330 335
 Arg Ile Cys Trp Cys Ala Asp Thr Gln Asp Arg Met Phe Leu Ile Thr
 340 345 350
 Tyr His Pro Arg His Pro Ser Leu Val Ile Ala Ser Gly Asp Cys Gly
 355 360 365
 Thr Gly Tyr Trp His Ile Thr Ser Ile Gly Lys Phe Ile Ser Asp Cys
 370 375 380

ES 2 596 880 T3

Met Glu Gly Thr Leu Glu Glu Arg Phe Ala Lys Phe Trp Arg Trp Arg
385 390 395 400

Pro Glu Lys Phe Thr Glu Phe Trp Gly Lys Asp Pro Leu Asp Arg Phe
405 410 415

Gly Ala Asp Asp Lys Ile Met Asp Leu Pro Lys Ser Asp Val Glu Gly
420 425 430

Trp Thr Asn Ile Lys Asn Asp Ile
435 440

<210> 10

5 <211> 440

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <221> MUTÁGENO

<222> (372)

<223> Oxidasa de fructosilamina mutada Lys372 a Met

<400> 10

15

ES 2 596 880 T3

Ala Ser Thr Leu Thr Lys Gln Ser Gln Ile Leu Ile Val Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Thr Trp Gly Cys Ser Thr Ala Leu His Leu Ala Arg Arg Gly Tyr Thr
 20 25 30

Asn Val Thr Val Leu Asp Val Asn Arg Ile Pro Ser Pro Ile Ser Ala
 35 40 45

Gly His Asp Val Asn Lys Leu Ala Gly Arg Leu Ser Thr Ala Asp Ser
 50 55 60

Lys Gly Asp Asp Glu Asp Ser Ile Trp Lys Ala Leu Ser Tyr Ala Ala
 65 70 75 80

Ala Gln Gly Trp Leu His Asp Pro Val Phe Gln Pro Phe Cys His Asn
 85 90 95

Thr Gly Ser Val Val Ala Gly Ser Thr Pro Lys Ser Ile Lys Gln Leu
 100 105 110

Val Glu Asp Glu Ile Gly Asp Asp Ile Asp Gln Tyr Thr Pro Leu Asn
 115 120 125

Thr Ala Glu Asp Phe Arg Lys Thr Met Pro Glu Gly Ile Leu Thr Gly
 130 135 140

Asn Phe Pro Gly Trp Lys Gly Phe Tyr Lys Pro Thr Gly Ser Gly Trp
 145 150 155 160

ES 2 596 880 T3

Val His Ala Arg Lys Ala Met Lys Ala Ala Phe Glu Glu Ser Glu Arg
 165 170 175
 Leu Gly Val Lys Phe Ile Thr Gly Ser Pro Glu Gly Lys Val Glu Ser
 180 185 190
 Leu Ile Phe Glu Asp Gly Asp Val Arg Gly Ala Lys Thr Ala Asp Gly
 195 200 205
 Lys Glu His Arg Ala Asp Arg Thr Ile Leu Ser Ala Gly Ala Ser Ala
 210 215 220
 Glu Phe Phe Leu Asp Phe Glu Asn Gln Ile Gln Pro Thr Ala Trp Thr
 225 230 235 240
 Leu Gly His Ile Gln Ile Thr Pro Glu Glu Thr Lys Leu Tyr Lys Asn
 245 250 255
 Leu Pro Pro Leu Phe Asn Ile Asn Gln Gly Phe Phe Met Glu Pro Asp
 260 265 270
 Glu Asp Leu His Gln Leu Lys Met Cys Asp Glu His Pro Gly Tyr Cys
 275 280 285
 Asn Trp Val Glu Lys Pro Gly Ser Lys Tyr Pro Gln Ser Ile Pro Phe
 290 295 300
 Ala Lys His Gln Val Pro Thr Glu Ala Glu Arg Arg Met Lys Gln Phe
 305 310 315 320
 Leu Lys Asp Ile Met Pro Gln Leu Ala Asp Arg Pro Leu Val His Ala
 325 330 335
 Arg Ile Cys Trp Cys Ala Asp Thr Gln Asp Arg Met Phe Leu Ile Thr
 340 345 350
 Tyr His Pro Arg His Pro Ser Leu Val Ile Ala Ser Gly Asp Cys Gly
 355 360 365
 Thr Gly Tyr Met His Ile Thr Ser Ile Gly Lys Phe Ile Ser Asp Cys
 370 375 380
 Met Glu Gly Thr Leu Glu Glu Arg Phe Ala Lys Tyr Trp Arg Trp Arg
 385 390 395 400
 Pro Glu Lys Phe Thr Glu Phe Trp Gly Lys Asp Pro Leu Asp Arg Phe
 405 410 415
 Gly Ala Asp Asp Lys Ile Met Asp Leu Pro Lys Ser Asp Val Glu Gly
 420 425 430
 Trp Thr Asn Ile Lys Asn Asp Ile
 435 440

<210> 11

<211> 440

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> MUTÁGENO

<222> (372)

5 <223> Oxidasa de fructosilamina mutada Lys372 a val

<400> 11

Ala Ser Thr Leu Thr Lys Gln Ser Gln Ile Leu Ile Val Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Thr Trp Gly Cys Ser Thr Ala Leu His Leu Ala Arg Arg Gly Tyr Thr
 20 25 30
 Asn Val Thr Val Leu Asp Val Asn Arg Ile Pro Ser Pro Ile Ser Ala
 35 40 45
 Gly His Asp Val Asn Lys Leu Ala Gly Arg Leu Ser Thr Ala Asp Ser
 50 55 60
 Lys Gly Asp Asp Glu Asp Ser Ile Trp Lys Ala Leu Ser Tyr Ala Ala
 65 70 75 80
 Ala Gln Gly Trp Leu His Asp Pro Val Phe Gln Pro Phe Cys His Asn
 85 90 95
 Thr Gly Ser Val Val Ala Gly Ser Thr Pro Lys Ser Ile Lys Gln Leu
 100 105 110
 Val Glu Asp Glu Ile Gly Asp Asp Ile Asp Gln Tyr Thr Pro Leu Asn
 115 120 125
 Thr Ala Glu Asp Phe Arg Lys Thr Met Pro Glu Gly Ile Leu Thr Gly
 130 135 140
 Asn Phe Pro Gly Trp Lys Gly Phe Tyr Lys Pro Thr Gly Ser Gly Trp
 145 150 155 160
 Val His Ala Arg Lys Ala Met Lys Ala Ala Phe Glu Glu Ser Glu Arg
 165 170 175
 Leu Gly Val Lys Phe Ile Thr Gly Ser Pro Glu Gly Lys Val Glu Ser
 180 185 190
 Leu Ile Phe Glu Asp Gly Asp Val Arg Gly Ala Lys Thr Ala Asp Gly

ES 2 596 880 T3

195					200					205					
Lys	Glu	His	Arg	Ala	Asp	Arg	Thr	Ile	Leu	Ser	Ala	Gly	Ala	Ser	Ala
	210					215					220				
Glu	Phe	Phe	Leu	Asp	Phe	Glu	Asn	Gln	Ile	Gln	Pro	Thr	Ala	Trp	Thr
225					230					235					240
Leu	Gly	His	Ile	Gln	Ile	Thr	Pro	Glu	Glu	Thr	Lys	Leu	Tyr	Lys	Asn
				245					250					255	
Leu	Pro	Pro	Leu	Phe	Asn	Ile	Asn	Gln	Gly	Phe	Phe	Met	Glu	Pro	Asp
			260					265					270		
Glu	Asp	Leu	His	Gln	Leu	Lys	Met	Cys	Asp	Glu	His	Pro	Gly	Tyr	Cys
		275					280					285			
Asn	Trp	Val	Glu	Lys	Pro	Gly	Ser	Lys	Tyr	Pro	Gln	Ser	Ile	Pro	Phe
	290					295					300				
Ala	Lys	His	Gln	Val	Pro	Thr	Glu	Ala	Glu	Arg	Arg	Met	Lys	Gln	Phe
305					310					315					320
Leu	Lys	Asp	Ile	Met	Pro	Gln	Leu	Ala	Asp	Arg	Pro	Leu	Val	His	Ala
				325					330					335	
Arg	Ile	Cys	Trp	Cys	Ala	Asp	Thr	Gln	Asp	Arg	Met	Phe	Leu	Ile	Thr
			340					345					350		
Tyr	His	Pro	Arg	His	Pro	Ser	Leu	Val	Ile	Ala	Ser	Gly	Asp	Cys	Gly
		355					360					365			
Thr	Gly	Tyr	Val	His	Ile	Thr	Ser	Ile	Gly	Lys	Phe	Ile	Ser	Asp	Cys
	370					375					380				
Met	Glu	Gly	Thr	Leu	Glu	Glu	Arg	Phe	Ala	Lys	Tyr	Trp	Arg	Trp	Arg
385					390					395					400
Pro	Glu	Lys	Phe	Thr	Glu	Phe	Trp	Gly	Lys	Asp	Pro	Leu	Asp	Arg	Phe
				405					410					415	
Gly	Ala	Asp	Asp	Lys	Ile	Met	Asp	Leu	Pro	Lys	Ser	Asp	Val	Glu	Gly
			420					425					430		
Trp	Thr	Asn	Ile	Lys	Asn	Asp	Ile								
		435					440								

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición para el análisis de proteínas glicosiladas en una muestra, que comprende una proteasa, una oxidasa de fructosil aminoácido (FOD) y un estabilizador de la proteasa seleccionado del grupo que comprende dimetilsulfóxido, alcohol y cloruro de sodio.
- 10 2. Composición, según la reivindicación 1, que comprende además un estabilizador para la oxidasa de fructosil aminoácido seleccionado del grupo que comprende alcohol de azúcar, sacarosa, sal de magnesio soluble en agua, sal de calcio soluble en agua, sulfato de amonio, aminoácido y sarcosina.
- 15 3. Composición, según la reivindicación 1 ó 2, en la que la proteasa procede de un microorganismo que pertenece al género *Bacillus*.
4. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición es un producto líquido.
- 20 5. Procedimiento para el análisis de proteínas glicosiladas utilizando una proteasa y una enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado, caracterizado porque un estabilizador de la proteasa seleccionado del grupo que comprende dimetilsulfóxido, alcohol y cloruro de sodio, se añade a la proteasa.
- 25 6. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que se añade un estabilizador para la enzima que reacciona, como mínimo, con un aminoácido glicosilado seleccionado del grupo que comprende alcohol de azúcar, sacarosa, sal de magnesio soluble en agua, sal de calcio soluble en agua, sulfato de amonio, aminoácido y sarcosina.
7. Procedimiento, según la reivindicación 5 ó 6, en el que la proteasa procede de un microorganismo que pertenece al género *Bacillus*.
- 30 8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que las proteínas glicosiladas se analizan mediante la reacción de una muestra con una oxidasa de fructosilaminoácido y después con la proteasa.

Fig. 1

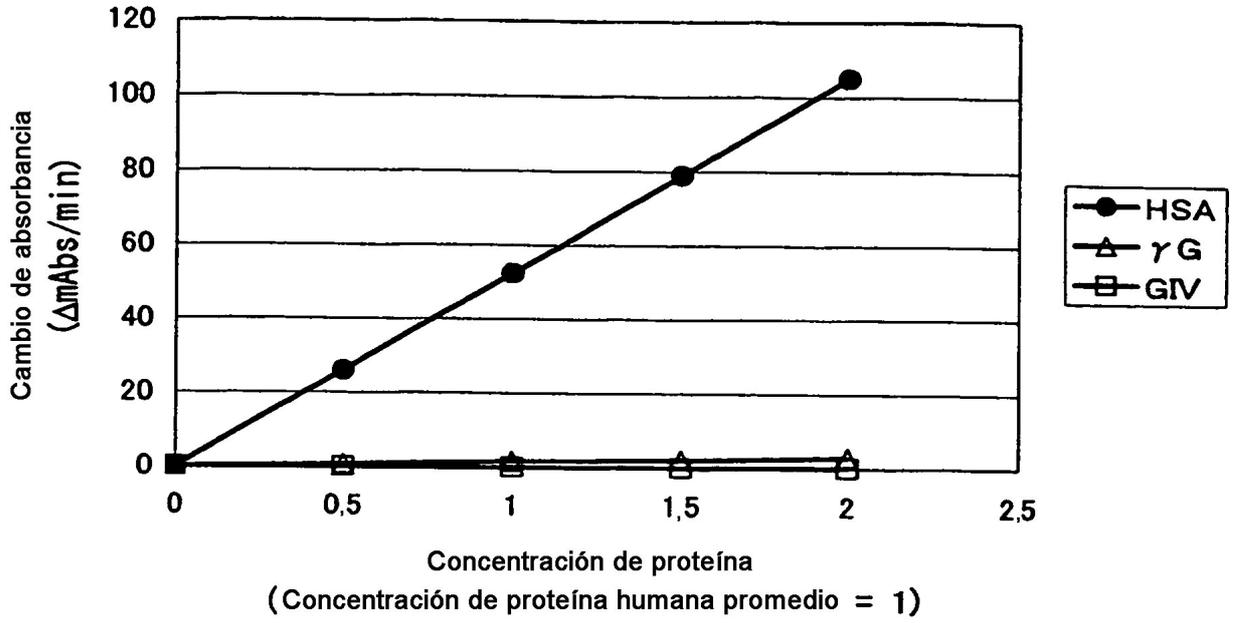


Fig. 2

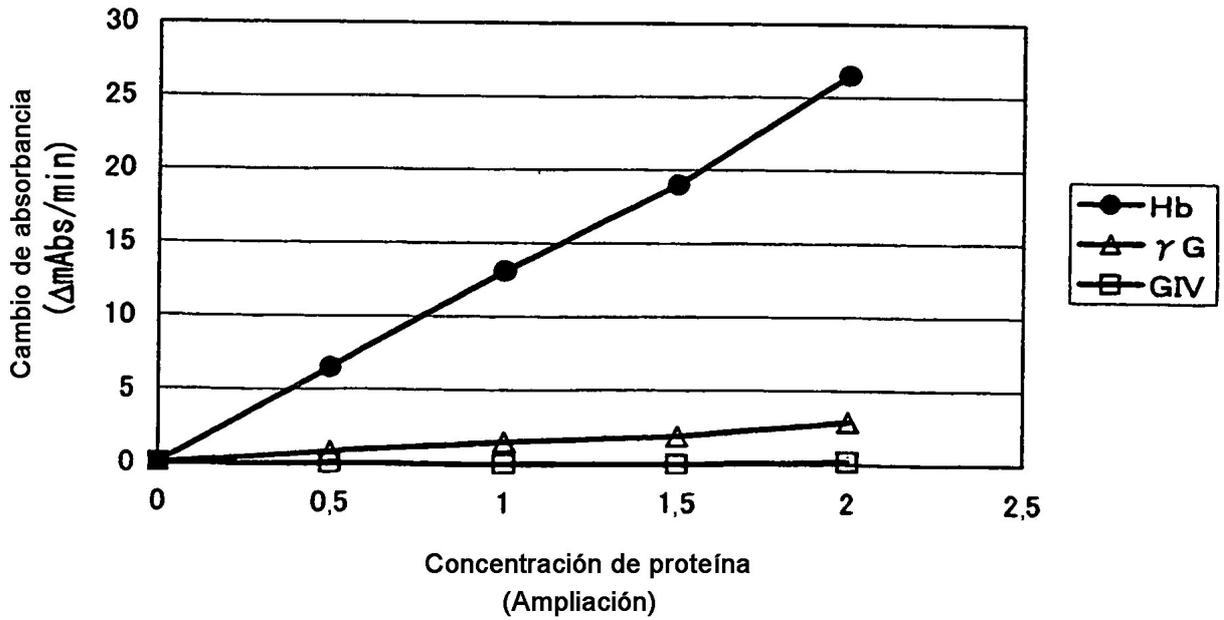


Fig. 3 Linealidad en el ensayo de GA

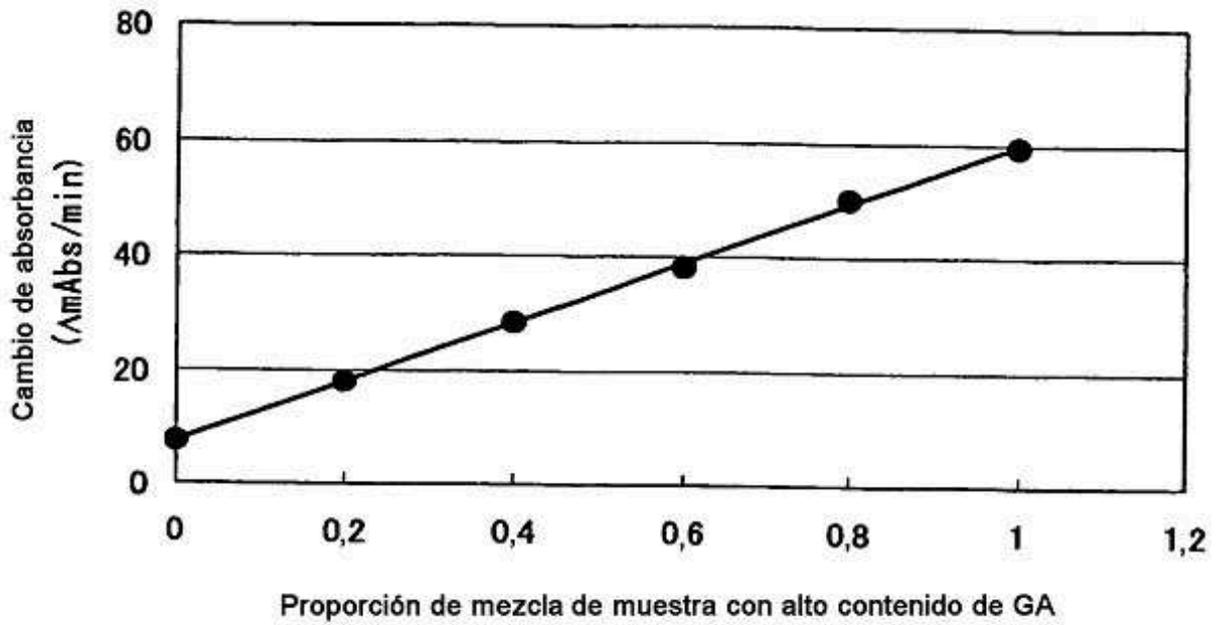


Fig. 4 Efecto del agente tampón en la estabilidad de la eliminación del ácido ascórbico

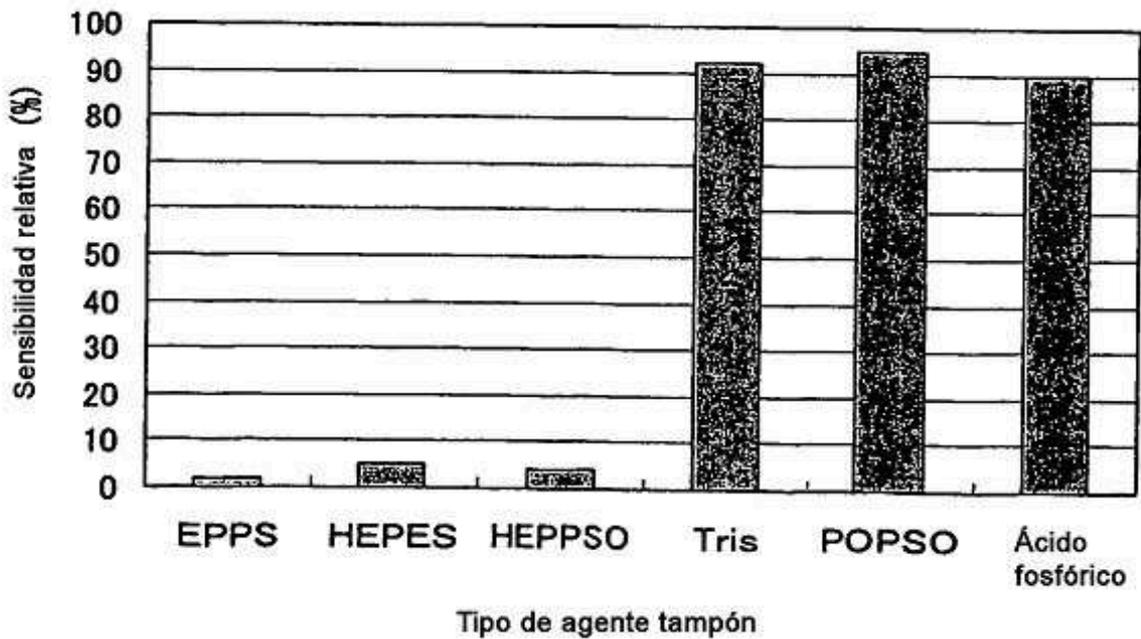


Fig. 5 Efecto del estabilizador y estabilidad de almacenamiento del reactivo de pretratamiento

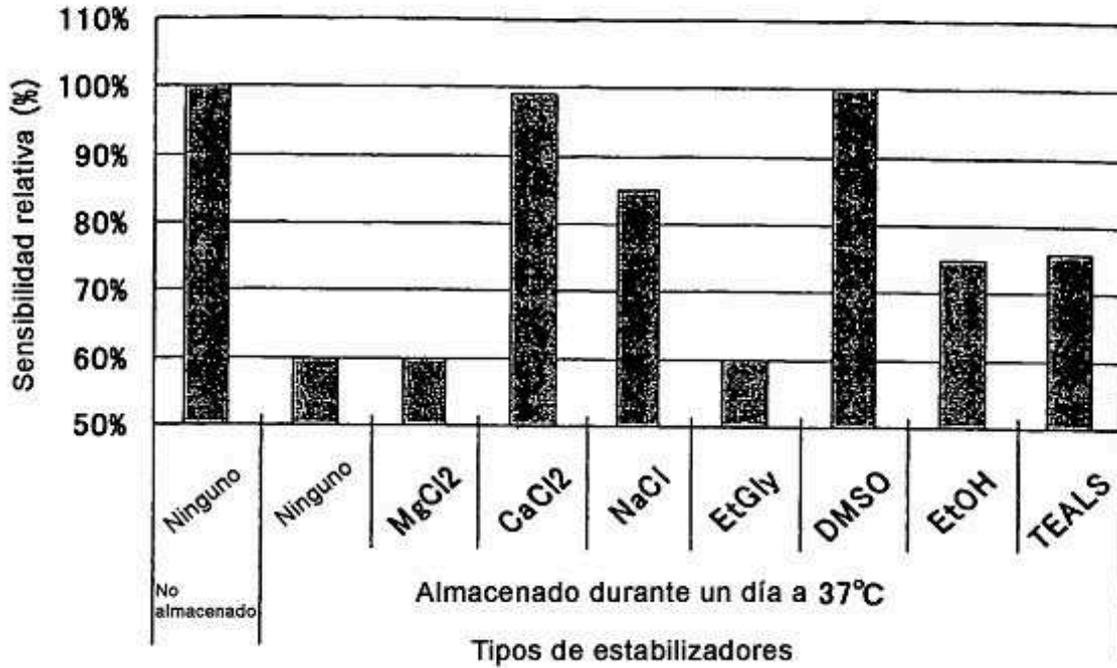


Fig. 6 Estabilización del estabilizador de aminoácidos glicosilados

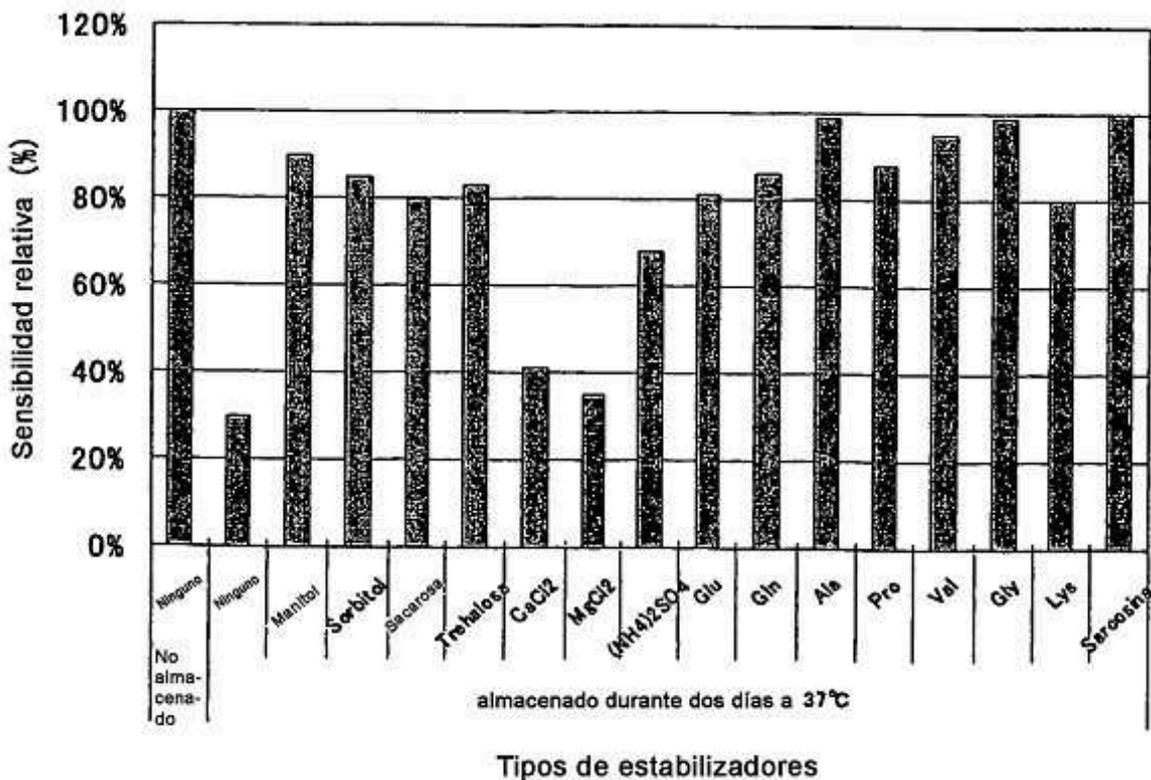


Fig. 7

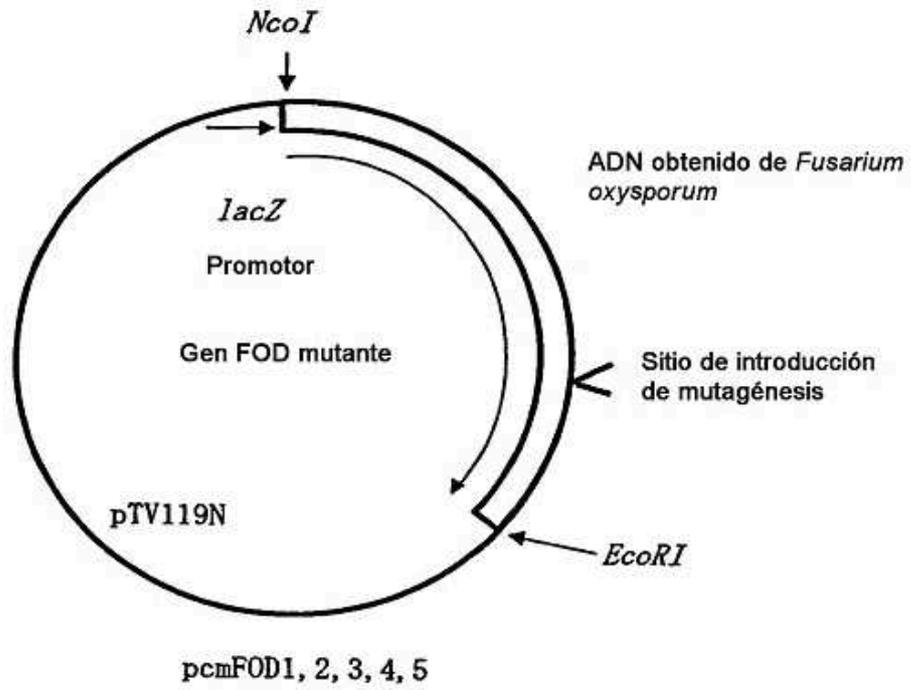


Fig. 8

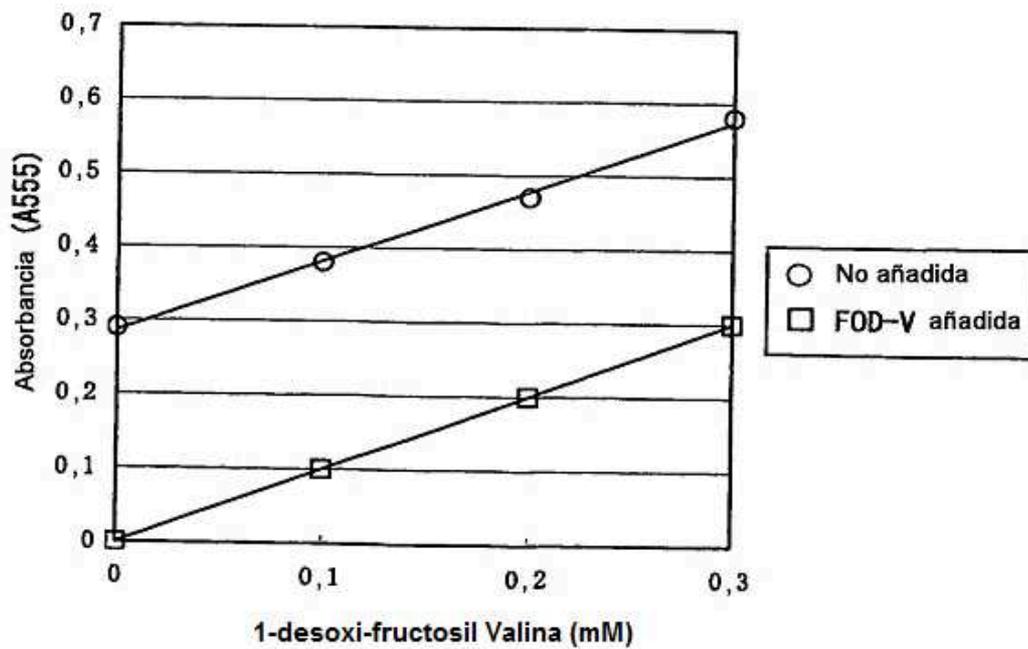


Fig. 9 Correlación entre el procedimiento de HPLC y el procedimiento enzimático

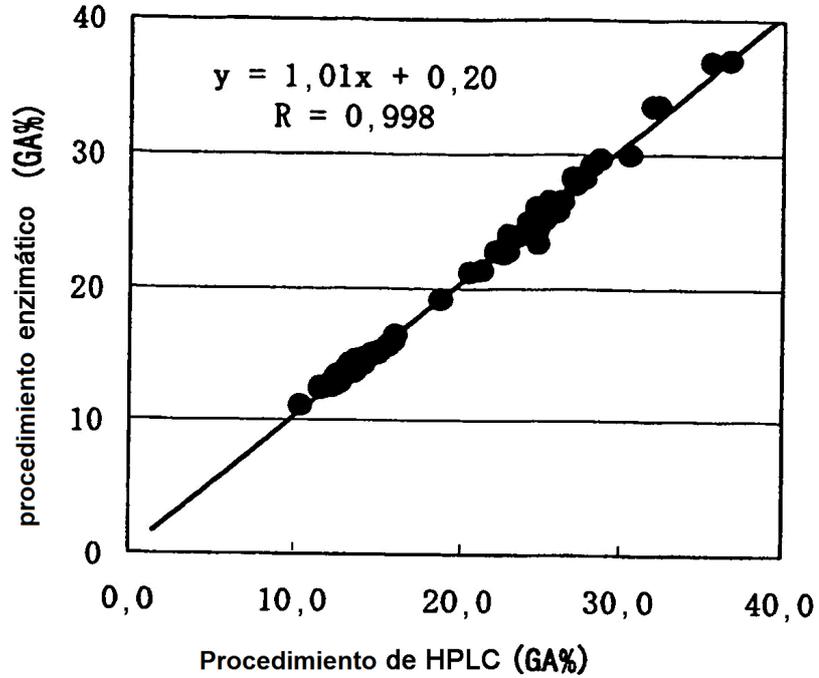


Fig. 10 Curva de reacción para la composición que utiliza el segundo reactivo que contiene proteasa

