

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 958**

51 Int. Cl.:

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/72 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2010 E 16155015 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 3043182**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales contra las variantes de hemoglobina C, S, E y D**

30 Prioridad:

18.11.2009 US 262488 P
08.11.2010 US 941738

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

30.04.2018

73 Titular/es:

BIO-RAD LABORATORIES, INC. (100.0%)
1000 Alfred Nobel Drive
Hercules, CA 94547, US

72 Inventor/es:

WALKER, ROGER y
JARDIN, BENEDICTE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 665 958 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

Anticuerpos monoclonales contra las variantes de hemoglobina C, S, E y D

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de los anticuerpos monoclonales contra variantes de hemoglobina glicadas y no glicadas HbC, HbS, HbE y HbD.

2. Descripción de la técnica anterior

10 Para los individuos que padecen diabetes mellitus tipo 1 o tipo 2, el mantenimiento del control glucémico es de máxima importancia, y dicho mantenimiento necesita la determinación del nivel de hemoglobina HbA_{1c} en la sangre de estos individuos. Como la diabetes alcanza proporciones de epidemia global, es particularmente importante tener ensayos de HbA_{1c} precisos y reproducibles. Los ensayos de HbA_{1c} se utilizaron también en la exploración de individuos respecto a diabetes.

15 Las mediciones de HbA_{1c} para tanto el control como la exploración de pacientes se toman como una media sobre la vida de un eritrocito. Esta media está comprometida por varias condiciones fisiológicas, entre las cuales es notable la presencia de variantes de hemoglobina y talasemias en la sangre del paciente. Las variantes de hemoglobina son prevalentes entre ciertos grupos étnicos y en ciertas regiones geográficas. De las más de 800 variantes conocidas en todo el mundo, las más comunes son HbS, HbC, HbD, y HbE. La HbS es la más prevalentes entre los individuos descendientes de africanos, la HbD entre los individuos descendientes del Punjab indio, y HbE entre los individuos del sureste de Asia. Otras formas conocidas de hemoglobina es la HbF (hemoglobina fetal) y HbA₂, que pueden estar ambas elevadas en talasemia, una afección relativamente común caracterizada por un desequilibrio de las subunidades alfa y beta de la hemoglobina. Las beta talasemias también pueden existir en presencia de HbE y HbS, y el rasgo combinado de falciforme/talasemia beta existe más frecuentemente entre los individuos de ascendencia mediterránea. Las variantes y las talasemias pueden producir inexactitudes en las mediciones de la HbA_{1c} afectando factores tales como la supervivencia de los glóbulos rojos y las tasas de glicosilación. Las variantes también afectan a los niveles determinados inmunológicamente de hemoglobina glicada ya que la inmunorreactividad difiere de una variante glicada a la siguiente y también entre variantes glicadas en la propia HbA. Los profesionales de la salud deben saber por lo tanto de la presencia de variantes y sus proporciones relativas con respecto a HbA, así como la presencia de talasemias para conseguir una determinación apropiada del control de la glucemia.

25 También, la enfermedad de hemoglobina D en niños se vuelve manifiesta por la presencia de HbD y la ausencia de HbA (véase, "Hemoglobin D Disease", Fact Sheet for Health Care Providers 08/2008, Utah Department of Health).

30 Las determinaciones de variantes de hemoglobina se hacen normalmente por separado de las determinaciones de HbA_{1c} independientemente de si está presente una variante conocida actualmente. Se han desarrollado anticuerpos contra variantes específicas con este fin, y lo siguiente es una muestra de informes de dichos anticuerpos:

35 HbS: Jensen, R.H., y col., "Monoclonal antibodies specific for sickle cell hemoglobin," Hemoglobin 9(4), 349-362 (1985)

HbS: Epstein, N., y col., "Monoclonal antibody-based methods for quantitation of hemoglobins: application to evaluating patients with sickle cell anemia treated with hydroxyurea," Eur. J. Haematol. 57(1), 17-24 (1996)

HbA: Rosenthal, M.A., y col., "Binding specificity of a monoclonal antibody to human HbA," Hemoglobin 19(3-4), 191-196 (1995)

40 HbS y HbA: Jensen, R.H., y col., "Monoclonal antibodies to human hemoglobin S and cell lines for the production thereof", US 4,752,583, expedida el 21 de junio de 1988

HbS y HbC: Garver, E.A., y col., "Screening for hemoglobins S and C in newborn and adult blood with a monoclonal antibody in an ELISA procedure," Annals of Hematology 60(6), 334-338 (1990)

45 Hb con sustituciones de aminoácidos únicas: Stanker, L.H., y col., "Monoclonal antibodies recognizing single amino acid substitutions in hemoglobin," J. Immunol. 136 (11), 4174-4180 (1986)

Variantes de Hb: Moscoso, H., y col., "Enzyme immunoassay for the identification of hemoglobin variants," Hemoglobin 14(4), 389-98 (1990)

50 Variantes de Hb: Schultz, J.C., "Utilization of monoclonal antibody-based assay HemoCard in screening for and differentiating between genotypes of sickle cell disease and other hemoglobinopathies," J. Clin. Lab. Anal. 9(6), 366-374 (1995)

Pan-specific, i.e. specific for all structural variants of glycosylated hemoglobin, monoclonal antibodies: Jensen, S. S.,

"Pan-specific monoclonal antibody", documento WO 02/088185, publicado el 7 de noviembre de 2002.

Los procedimientos generales para la determinación de variantes de hemoglobina se desvelan en:

Rosenthal, M.A., y col., "Monoclonal antibody immunoassay for the identification of hemoglobin variants in neonatal screening", *Screening* 3, 67-76 (1994), y
 5 Likuski, R., y col., "Calibration surface method for determination of analyte ratios", documento WO 2010/021914 publicado el 25 de febrero de 2010.

A pesar de estos informes y otros, las determinaciones de variantes se llevan a cabo en este momento por cromatografía líquida de altas prestaciones (HPLC) o electroforesis. La HPLC puede ser un rápido medio además para la obtención del nivel de HbA_{1c}, pero se necesitan gradientes de HPLC extendidos para la detección y
 10 cuantificación de las variantes y talasemias ya que las impurezas de la HPLC se co-eluyen con las variantes, y las diferentes variantes tienden a co-eluirse entre ellas. De hecho, ciertas variantes no se pueden resolver por HPLC, incluso con los gradientes de HPLC más optimizados. Normalmente, se utilizan procedimientos separados para mediciones rápidas de A_{1c} y ensayos de variantes y talasemia, haciendo imposible por lo tanto determinar simultáneamente el nivel de A_{1c} y el estatus de variantes o talasemia por HPLC, mucho menos de una manera
 15 rápida.

Los ensayos que proporcionan la detección simultánea de múltiples analitos se denominan ensayos "múltiplex", y las divulgaciones de ensayos múltiplex que utilizan reacciones de unión tipo afinidad sobre la superficie de perlas se detectan entonces por citometría se desvelan en las siguientes patentes:

20 Watkins, M.I., y col., "Magnetic particles as solid phase for multiplex flow assays", documento US 6,280,618 B2, presentado el 28 de agosto de 2001

Watkins, M.I., y col., "Magnetic particles as solid phase for multiplex flow assays", documento US 6,872,578 B2, presentado el 29 de marzo de 2005

Thomas, N., "Multiple assay method", documento US 6,913,935 B1, presentado el 5 de julio de 2005

25 Hechinger, M., "Platelet immunoglobulin bead suspension and flow cytometry", documento US 6,933,106 B1, presentado el 23 de agosto de 2005

Hechinger, M., "Anti-platelet immunoglobulin bead positive control", documento US 6,951,716 B1, presentado el 4 de octubre de 2005

Watkins, M.I., y col., "Multi-analyte diagnostic test for thyroid disorders", documento US 7,271,009 B1, presentado el 8 de septiembre de 2007

30 Bell, M.L., "Assay procedures and apparatus", documento US 7,326,573 B2, presentado el 5 de febrero de 2008

Song, Y., y col., "Multiplex protein interaction determinations using glutathione-GST binding", documento US 2002/0115116 A1, publicado el 22 de agosto de 2002

El éxito de los ensayos múltiplex para ciertas combinaciones de analitos no proporciona sin embargo la seguridad, o incluso un alto nivel de expectativa, de que se alcanzará un éxito similar para todas las combinaciones de analitos, particularmente las combinaciones con un alto nivel de homología entre los analitos. La hemoglobina y sus variantes y las formas glicadas son una de dicha combinación. Los ensayos múltiplex implican una pluralidad de diferentes inmunorreactivos en una mezcla íntima en un medio de reacción común, que crea una competición entre los
 35 inmunorreactivos por los diferentes analitos, más que en medios en los que está presente un único inmunorreactivo, y las reactividades cruzadas se producen en múltiples direcciones. Los conjuntos de las propias perlas también se deben diferenciar al mismo tiempo que se llevan a cabo los inmunoensayos. Esta diferenciación, sea por el uso de diferentes colorantes o diferentes conjuntos de perlas, un tamaño diferente de cada conjunto de perlas, u otros factores de diferenciación conocidos, añade un nivel adicional de complejidad y oportunidades adicionales de interacción.

Sumario de la invención

45 La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas y reside en el hallazgo de que las variantes de hemoglobina se pueden diferenciar entre ellas y de la HbA_{1c} y de la hemoglobina total, y medirse los valores de cada una, en un inmunoensayo múltiplex. El ensayo puede, por ejemplo, detectar una única variante además de la HbA_{1c} y la hemoglobina total o dos o más variantes y la hemoglobina total. Cuando se detectan dos o más variantes, se pueden seleccionar diferentes combinaciones de las variantes, aunque preferentemente el ensayo incluirá las cuatro
 50 variantes más comunes, HbS, HbC, HbE, y HbD. El ensayo puede incluir también la medición de HbA₂ y HbF. Se desvela un procedimiento para detectar e identificar la presencia de variantes de hemoglobina en la sangre de un paciente. También se desvela un procedimiento para medir el nivel de HbA_{1c} con respecto a la hemoglobina total mientras que se corrige el resultado por la presencia de variantes que también pueden estar presentes. En el presente documento también, la corrección puede ser por variantes individuales o combinaciones de variantes.

También se devela un procedimiento para la detección simultánea de A_{1c} y variantes de hemoglobina sin corrección, lo que es útil en ciertos casos. Se devela adicionalmente la medición de niveles de variantes particulares en forma glicada. Cuando se sabe que una variante está presente, se puede medir la versión glicada de esa variante y añadirla al nivel de HbA_{1c} para obtener una indicación precisa de la hemoglobina glicada total.

5 La invención proporciona anticuerpos que tienen una afinidad de unión selectiva por las variantes de hemoglobina que se pueden utilizar en los procedimientos desvelados en el presente documento. En algunas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une selectivamente a la variante de hemoglobina HbC y la HbC glicada, en el que el anticuerpo monoclonal se une a un epítipo mínimo de HbC ⁴TPKEKSAVT¹². En particular, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une selectivamente a la variante de hemoglobina HbS y la HbS glicada, en la que el anticuerpo monoclonal se une a un epítipo mínimo de HbS ³LTPVEKSAVT¹². Además, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une selectivamente a la variante de hemoglobina HbE y HbE glicada, en el que el anticuerpo se une a un epítipo mínimo de HbE ²²EVGGK²⁶ o a ²¹DEVGGK²⁶. Incluso adicionalmente, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une selectivamente a la variante de hemoglobina HbD y la HbD glicada, en el que el anticuerpo monoclonal se une a un epítipo mínimo de HbD ¹²¹QFTTP¹²⁵ o a ¹¹⁹GKQTPP¹²⁵.

El procedimiento desvelado puede emplear también un anticuerpo, sea un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal que se une selectivamente a la hemoglobina total (en comparación con polipéptidos no hemoglobina). Un anticuerpo policlonal pan-reactivo para su uso en el procedimiento se une a uno o más epítipos presentes en las regiones siguientes de la alfa globina y la beta globina: ⁴⁹SHGSAQVKGHGKKVADALNAVAHVDDMPUNALSALSD HLHAHKLRRVDPV⁹⁶, betaglobina ¹⁵WGKVVNDEVGGGALG³⁰, ⁴⁵FGDLSTP⁵¹, y ⁷⁶AHLDNLKGTFFAT⁸⁷. Un anticuerpo pan-reactivo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal que se une al epítipo ⁹SAVTALWGKVVN²⁰ (beta globina) o ⁸KSAVTALWGKVVN²⁰ o ¹¹VTALW¹⁵ o a un epítipo mínimo de betaglobina que comprende la secuencia ALWG o VTX₉LW, en el que X₉ es uno de los 20 aminoácidos comunes de origen natural. Un anticuerpo para su uso en el procedimiento se puede unir a un epítipo en la beta globina, por ejemplo, ⁸KSAVTALWGKVVN²⁰, ⁵⁸PKVKAHGKVLGAF⁷¹ o ⁸⁷TSELHCDKLHVDPENFR¹⁰⁴ (betaglobina).

Se desvelan adicionalmente anticuerpos monoclonales que se unen selectivamente a formas glicadas de hemoglobina, incluyendo la unión a hemoglobinas normales y variantes, pero no se unen a formas no glicadas de hemoglobina, un resto glicosilado ¹V y un resto ³H son normalmente importante para la unión de dichos anticuerpos.

El procedimiento que se devela en el presente documento puede comprender adicionalmente la detección de otras variantes de hemoglobina utilizando anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, que se unen selectivamente a dichas variantes.

Normalmente un anticuerpo de la invención tiene una K_D que está en el intervalo de desde 10⁻⁶ M a 10⁻¹² M. El anticuerpo puede tener una K_D que está en el intervalo de desde 10⁻⁷ M a 10⁻¹¹ M. De manera alternativa, el anticuerpo puede tener una K_D que está en el intervalo de desde 10⁻⁸ M a 10⁻¹⁰ M. Normalmente, la K_D está en el intervalo nM, por ejemplo, cualquiera desde 10⁻⁹ M a 10⁻¹⁰ M.

Estas y otras características, objetivos y ventajas de la invención se entenderán mejor a partir de la siguiente descripción.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 proporciona una representación esquemática de un ejemplo de inmunoensayo sándwich para la medición de hemoglobina glicada y variantes de hemoglobina.

La FIG. 2 es un gráfico de los datos comparativos entre una serie de ensayos múltiple como se devela en el presente documento y una serie de ensayos HPLC.

Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas

Las variantes de hemoglobina que se van a detectar por el procedimiento desvelado en el presente documento son cualquiera de las variantes conocidas de que se informa en la bibliografía o conocidas de otra manera por los clínicos e investigadores expertos en la tecnología de la hemoglobina, hemoglobina glicada, y diabetes. Como se ha señalado anteriormente, las cuatro variantes más comunes de hemoglobina son HbS, HbC, HbE y HbD, aunque se pueden detectar otras variantes además de estas cuatro o en lugar de una o más de ellas. Por ejemplo, dos variantes que están elevadas en la beta talasemia son HbF y HbA₂. Los miembros de la unión que se utiliza para cada una de esas variantes en el ensayo múltiple son generalmente anticuerpos monoclonales, preferentemente los que se desarrollan expresamente para el ensayo múltiple. Los anticuerpos se unen preferentemente a los epítipos de las variantes que distinguen cada variante de otras variantes para minimizar la reactividad cruzada, y más importantemente que distinguen las variantes de la hemoglobina tipo silvestre A0. Cuando se necesita el uso de un valor para la concentración de hemoglobina total en la muestra, la concentración se puede determinar por un procedimiento de inmunoensayo o un procedimiento no-inmunoensayo. Un ejemplo de un procedimiento no inmunoensayo es la determinación de la densidad óptica. Otros ejemplos serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica de la hemoglobina. Cuando se determina la hemoglobina total por un inmunoensayo, la

determinación se puede llevar a cabo como una parte del ensayo múltiple. El anticuerpo para la hemoglobina total en el ensayo múltiple puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal, y el anticuerpo para HbA_{1c} puede ser o un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal, preferentemente un anticuerpo monoclonal.

Anticuerpos

5 Como se utiliza en el presente documento, un “anticuerpo” se refiere a una proteína definida funcionalmente como una proteína de unión y definida estructuralmente como que comprende una secuencia de aminoácido que es reconocida por un experto como que se deriva de una región marco conservada de un gen que codifica una inmunoglobulina de un animal que produce anticuerpos. Un anticuerpo puede consistir en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulinas. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, epsilon y mu, así como una miríada de genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o epsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

15 Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) típico se sabe que comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par tiene una cadena “ligera” (de aproximadamente 25 kD) y una “pesada” (de aproximadamente 50 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de 100 a 110 o más aminoácidos, responsable primariamente del reconocimiento antigénico. Las expresiones cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refiere a estas cadenas ligera y pesada, respectivamente.

20 El término anticuerpo como se utiliza en el presente documento incluye fragmentos de anticuerpo que mantengan la especificidad de unión. Por ejemplo, hay varios fragmentos de anticuerpo bien caracterizados. Por lo tanto, por ejemplo, la pepsina digiere el extremo C hasta los enlaces disulfuro en la región de bisagra para producir F(ab')₂, un dímero de Fab que por sí mismo es una cadena ligera unido a una VH-CH1 (Fd) mediante un enlace disulfuro. El F(ab')₂ se puede reducir en condiciones leves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra convirtiendo de esta manera el dímero (Fab')₂ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con todo o parte de la región bisagra (véase, Fundamental Immunology, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpo). Mientras que distintos fragmentos de anticuerpo se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto en la técnica apreciará que los fragmentos se pueden sintetizar de novo sea químicamente o utilizando metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término “anticuerpo” también incluye fragmentos de anticuerpo producidos por la modificación de anticuerpos completos o sintetizados utilizando metodologías de ADN recombinante. Los anticuerpos incluyen dímeros tales como dímeros V_H-V_L, dímeros V_H, o dímeros V_L, incluyendo una única cadena de anticuerpos. De manera alternativa, el anticuerpo puede ser otro fragmento tal como un Fv estabilizado con disulfuro (dsFv). Otros fragmentos se pueden generar también utilizando técnicas conocidas, incluyendo la utilización de técnicas recombinantes. Los anticuerpos incluyen los que se han presentado en fagos o se han generado por tecnología recombinante utilizando vectores en los que las cadenas se secretan como proteínas solubles, por ejemplo, scFv, Fv, Fab, (Fab')₂ o generados por tecnología recombinante utilizando vectores en los que las cadenas se secretan como proteínas solubles.

40 Como se utiliza en el presente documento, un “miembro de unión inmunológica que tiene afinidad de unión selectiva” por un antígeno, por ejemplo, una variante de hemoglobina es normalmente un anticuerpo. Un miembro de unión que tiene afinidad de unión selectiva por un antígeno puede ser un péptido, por ejemplo, que se puede identificar explorando bibliotecas de péptidos, que tiene una interacción de unión selectiva con el antígeno.

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a las variantes de hemoglobina HbS, HbC, HbE, y HbD. La secuencia de la cadena beta de hemoglobina es la siguiente:

VHLTPEEKSAVTALWGKVVNDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLSTPDAVMGNPKVKAHGKKVL
 GAFSDGLAHL^{LD}NLKGTFATLSELHCDKLHVDPENFRLLGNVLCVLAHFGKEFTPPVQAA^YQKVVAG
 45 VANALAHKYH

Las posiciones de restos de aminoácidos en la cadena beta de hemoglobina a la que se hace referencia en el presente documento es con referencia a esta secuencia de aminoácidos a menos de que se especifique otra cosa.

La HbA_{1c} está glicada en la valina del extremo N. Las mutaciones puntuales de la cadena beta más prevalentes son HbS (Glu 6 → Val); HbC (Glu 6 → Lys); HbE (Glu 26 → Lys) y HbD (Glu 121 → Gln). Las posiciones Glu 6, Glu 26, y Glu 121 se indican subrayadas en la secuencia de la cadena beta.

La HbA₂ y HbF pueden determinarse también en el ensayo divulgado en el presente documento. La hemoglobina A₂ tiene dos cadenas alfa y dos cadenas beta; y la hemoglobina F tiene dos cadenas alfa y dos cadenas gamma.

En el contexto de la presente invención, la expresión “se une específicamente” o “inmunorreactivo específicamente (o selectivamente con”, o “tiene una afinidad selectiva por” se refiere a una reacción de unión en la que el anticuerpo se une al antígeno de interés. En el contexto de la presente invención, el anticuerpo se une al antígeno de interés, por ejemplo, HbS incluyendo la forma glicada de HbS, con una afinidad que es al menos 100 veces mejor que su afinidad por otros antígenos, por ejemplo, otras variantes de hemoglobina tal como HbA₀ o HbC.

“Reactividad” como se utiliza en el presente documento se refiere a la señal de unión relativa a partir de las reacciones de un anticuerpo con el antígeno al que se une específicamente frente a otros antígenos, tal como otras variantes de hemoglobina y/o la HbA₀ de tipo silvestre. La reactividad se evalúa utilizando tampones apropiados que permiten que se unan el antígeno y anticuerpo. La reactividad puede determinarse, por ejemplo, utilizando un ensayo ELISA directo o sándwich. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo en formato directo para determinar la reactividad con la hemoglobina de tipo silvestre y/o las variantes de hemoglobina cuando el antígeno se une directamente a la placa de ELISA, y los distintos anticuerpos se añaden para ver cuales se unen, seguido por la interrogación utilizando un anticuerpo anti-ratón marcado tal como el anticuerpo marcado con ficoeritrina. En el formato sándwich, el anticuerpo monoclonal está unido a la perla, seguido por la adición de antígeno, seguido por la interrogación con un anticuerpo de detección universal marcado con ficoeritrina, por ejemplo, un anticuerpo de detección universal marcado con ficoeritrina, que se une a todas las especies de hemoglobina. Por lo tanto, en un ejemplo que utiliza el formato sándwich, la reactividad se puede definir como la señal fluorescente relativa producida cuando el antígeno específico, por ejemplo, una variante de hemoglobina HbS, se une frente a otro antígeno, por ejemplo, una hemoglobina de tipo silvestre. Se considera que un anticuerpo es específico para un antígeno si presenta un aumento de dos veces, normalmente al menos de 3 o 4 veces, en su reactividad por el antígeno de referencia en comparación con otro antígeno que se ensaya.

“Epítipo” o “determinante antigénico” se refiere a un sitio en un antígeno en el que se une el anticuerpo. Los epítipos pueden formarse a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos se mantienen normalmente con la exposición a disolventes desnaturizantes mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario se pierden normalmente con el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo normalmente incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una única conformación espacial. Los procedimientos de mapeo de epítipos se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996)). Un epítipo “mínimo” en la presente invención se determina normalmente midiendo la unión del anticuerpo a los péptidos solapados que cubren toda la secuencia de aminoácidos de la globina beta o alfa y la identificación de la secuencia de aminoácidos compartida por los péptidos unidos. Los aminoácidos importantes en el epítipo “mínimo” se identifican normalmente por exploración de alanina.

Como se entiende en la técnica, un epítipo “mínimo” puede incluir sustituciones, por ejemplo, en posiciones que no son importantes para la unión, por ejemplo, como se determina utilizando exploración de alanina. Dichas sustituciones incluyen sustituciones conservadoras en las que la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares se conocen bien en la técnica. A continuación, se dan ejemplos de entre los veinte aminoácidos comunes de origen natural de aminoácido que se pueden sustituir por otros: alanina y glicina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina y glutamina; arginina y lisina; serina y treonina. Otras sustituciones conservadoras incluyen sustituciones de un aminoácido en el siguiente grupo con otro aminoácido en el grupo: isoleucina, leucina, metionina y valina. Fenilalanina, tirosina, y triptófano también son restos que se pueden sustituir entre ellos.

La tabla 1 proporciona ejemplos de inmunógenos utilizados para generar los anticuerpos monoclonales específicos contra la hemoglobina y variantes de hemoglobina.

Tabla 1

Ejemplos de inmunógenos peptídicos		
Hemoglobina diana	Nombre del péptido	secuencia
Hemoglobina y variantes	H1	H2N-VHLTPEEKSAVTALW-C-CONH2
	H2	H2N-VHLTPEEASASTASW-C-CONH2
	H2bis	H2N-VHLTPEEKSASTASW-C-CONH2
HbS	H3	H2N-VHLTPVEKSAVTALW-C-CONH2
HbC	H4	H2N-VHLTPKEKSAVTALW-C-CONH2
HbE	H5	H2N-CYG-NVDEVGKALGRLLV-CONH2
	H5bis	H2N-CYG-VTALWGKVNVDVGGK-CONH2
	H10	H2N-C-Hx-EVGGKALG-CONH2
	H10bis	H2N-EVGGKALG-Hx-C-CONH2

(continuación)

Ejemplos de inmunógenos peptídicos		
Hemoglobina diana	Nombre del péptido	secuencia
HbD	H6	H2N-CYG-VLAHHFGKQFTPPVQAA-CONH2
	H6bis	H2N-QFTPPVQAAYQKVAGV-GYC-CONH2
	H9	H2N-GKQFTGKQFTGKQFT-GYC-CONH2
	H11	H2N-C-Hx-HFGKQFTP-CONH2
	H11bis	H2N-HFGKQFTP-Hx-C-CONH2
HbA _{1c}	GP1	Glucosa-HN-VHLTPEE-Hx-C-CONH2
	GP3	1-desoxifructopiranosil-HN-VHLTPEE-Hx-C-CONH2
	H2 glicada	Glucosa-HN-VHLTPEEASASTASW-C-CONH2

La tabla 2 proporciona ejemplos de regímenes de inmunización utilizados para generar anticuerpos monoclonales específicos contra la hemoglobina y las variantes de hemoglobina.

Tabla 2

Ejemplos de regímenes de inmunización									
Secuencia de inyección	HbS	HbC	HbE	HbD	HbA1c	Hba y variantes			
1	antígeno HbS nativo	H4-KLH	H5bis-KLH	HbD + H6-KLH desnaturalizada	GP3-KLH	HbA0 nativa			
2	H3-KLH	H4-KLH	H5bis-KLH	HbD + H6-KLH desnaturalizada	GP3-KLH	H1-KLH			
3	H3-KLH	H4-KLH	H5bis-KLH	HbD + H6-KLH desnaturalizada	GP3-KLH	HbA0 nativa			
4	HbS + H3-KLH desnaturalizada	HbC desnaturalizada	H5bis-KLH	HbD + H6-KLH desnaturalizada	GP3-KLH	H1-KLH			
5	HbS + H3-KLH desnaturalizada	H4-KLH	HbE desnaturalizada	HbD + H6-KLH desnaturalizada					
6	HbS + H3-KLH desnaturalizada	H4-KLH	HbE desnaturalizada	HbD desnaturalizada					
7			HbE desnaturalizada	HbD + H6-KLH desnaturalizada					
8			H5bis-KLH	HbD + H6-KLH desnaturalizada					
9			H5bis-KLH	HbD + H6-KLH desnaturalizada					
10			HbE + H5bis-KLH desnaturalizada	HbD + H6-KLH desnaturalizada					
11			HbE + H5bis-KLH desnaturalizada						
12			HbE + H5bis-KLH desnaturalizada						
Vía de inyección	Subcutánea e intraperitoneal	Subcutánea e intraperitoneal	Subcutánea e intraperitoneal	Subcutánea e intraperitoneal	Intraperitoneal	Subcutánea e intraperitoneal			

Anticuerpos contra HbS

Las variantes de hemoglobina HbS tienen una mutación puntual en la que el ácido glutámico en la posición 6 de la cadena beta de hemoglobina está mutada en valina.

5 Los anticuerpos anti-HbS de la invención que son selectivos para HbS pueden tener las siguientes características de unión: el anticuerpo se une a HbS con una afinidad que es al menos 100 veces menor (es decir, mejor) que su afinidad por la HbC y la HbA0. El anticuerpo se puede unir al epítipo mínimo de HbS ⁵PVEKSAVT¹². Dicho anticuerpo puede tener una reactividad en la que la reactividad es tal que la valina en la posición 6 se puede reemplazar por una isoleucina, pero la sustitución con otros aminoácidos en esa posición da como resultado un aumento de 2 veces, a menudo de tres veces o más en la reactividad. ³LTP⁵, ⁷E, y ¹⁰A también pueden ser importantes para la unión.

10 El anticuerpo se une a un epítipo mínimo ³LTPVEKSAVT¹². El anticuerpo puede tener una reactividad en la que la valina en la posición 6 se puede sustituir por una isoleucina o alanina, pero la sustitución con otros aminoácidos en esa posición da como resultado una disminución de dos veces, a menudo de tres veces o más en la reactividad. ²HLTPVEK⁸ y ¹⁰A también pueden ser importantes para la unión.

15 Un anticuerpo que se une a un epítipo mínimo, por ejemplo, ⁵PVEKSAVT¹², puede unirse a las variantes del epítipo mínimo de HbS que tiene la valina en la posición 6, tal como un epítipo mínimo que comprende ⁵PVEX₂X₃A¹⁰, donde X₂ y X₃ se pueden seleccionar independientemente de entre los 20 aminoácidos comunes de origen natural, por ejemplo, sustituciones conservadoras de K y S, respectivamente.

20 El anticuerpo normalmente es una IgG, por ejemplo, el anticuerpo puede tener un isotipo IgG1, IgG2 o IgG3. La región constante de cadena ligera puede ser una cadena kappa. De manera alternativa, la región constante de cadena ligera puede ser una cadena lambda.

25 Un anticuerpo contra HbS de la invención se puede producir contra el inmunógeno HbS y H3-KLH : H₂N-VHLTPVEK-SAVTALW-C-CONH₂. De manera alternativa, el inmunógeno es una combinación de H3-KLH : H₂N-VHLTPVEKSAVTALW-C-CONH₂ y una HbS proteica nativa y/o desnaturalizada purificada, las inmunizaciones en serie utilizando los componentes individuales de los inmunógenos anteriores. También se pueden utilizar otros vehículos proteicos distintos de KLH. Ejemplo son albúmina y ovoalbúmina, y los ejemplos adicionales serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

30 Como se entiende en la técnica y se ilustra en la Tabla 1 anterior, se pueden utilizar muchas variaciones de inmunógenos para obtener el anticuerpo deseado. Por ejemplo, el inmunógeno peptídico KLH : H₂N-VHLTPVEKSAVTALW-C-CONH₂ puede tener también un carboxilato en el extremo C, mejor que una carboxamida en el extremo C. El resto cisteína de engarce puede espaciarse con un resto Hx, que es un ácido 6-aminohexanoico, o se puede emplear un espaciador, tal como una secuencia espaciadora gly-gly. Adicionalmente, la secuencia peptídica también puede variar.

35 Un anticuerpo anti-HbS normalmente se une a las formas glicada y no glicada de HbS con una afinidad similar. Por ejemplo, un anticuerpo anti-HbS normalmente se une selectivamente a ambas HbS glicada y no glicada con una reactividad de unión en la que hay menos de una diferencia de reactividad de tres veces, normalmente una diferencia de reactividad menor de dos veces, entre la unión a la HbS glicada frente a la no glicada.

Anticuerpos anti-HbC

40 La variante de hemoglobina HbC tiene una lisina sustituida por ácido glutámico en la posición 6 de la cadena beta de hemoglobina. Un anticuerpo monoclonal anti-HbC para su uso en la invención se une normalmente a la HbC con una afinidad que es al menos 100 veces mayor que la afinidad del anticuerpo por la HbS y la HbA0. El anticuerpo monoclonal se une al epítipo mínimo ⁴TPKEKSAVT¹². El anticuerpo puede tener una especificidad de unión de manera que los restos importantes para la unión son los restos ³LT⁴ y ⁶K. Los restos importantes para la unión pueden ser ³LT⁴ y ⁶KE⁷. La especificidad de unión puede también permitir la sustitución de lisina por arginina o histidina en la posición 6, pero la sustitución de otros aminoácidos da como resultado al menos una pérdida de reactividad de 2 veces, normalmente 3 veces o más. De manera alternativa, la reactividad del anticuerpo contra HbC puede ser de manera que la lisina en la posición 6 se puede sustituir con arginina, tirosina, asparagina, glutamina o glicina, pero la sustitución con otros restos de aminoácidos da como resultado una pérdida de reactividad.

50 Un anticuerpo que se une a un epítipo mínimo de HbC, por ejemplo, ⁴TPKEKSAVT¹², se puede unir a variantes del epítipo mínimo de HbC que tiene la K en la posición 6, tal como un epítipo mínimo que comprende ⁴TX₁KE⁷ o ³LTX₁KE⁷ donde X₁ puede ser uno de los 20 aminoácidos comunes de origen natural.

El anticuerpo normalmente es una IgG, por ejemplo, el anticuerpo puede tener un isotipo IgG1, IgG2 o IgG3. La región constante de la cadena ligera puede ser una cadena kappa. De manera alternativa la región constante de cadena ligera puede ser una cadena lambda.

55

Un anticuerpo de la invención se puede producir contra el inmunógeno H4-KLH : H₂N-VHLTPKEKSAVTALW-C-CONH₂. Ejemplos de otros inmunógenos peptídicos se enumeran en la Tabla 1, y aquí de nuevo, se pueden utilizar otros vehículos proteicos en lugar de KLH. La inmunización se puede llevar a cabo utilizando una combinación del péptido y la HbC proteica nativa y/o desnaturalizada. Las inmunizaciones secuenciales o en serie se pueden llevar a cabo utilizando los componentes individuales de los inmunógenos anteriores. Un protocolo de inmunización a modo de ejemplo se muestra en la Tabla 2. Como se ha explicado anteriormente en la sección relativa a los anticuerpos anti-HbS, un experto en la técnica puede diseñar fácilmente otros péptidos inmunogénicos para obtener un anticuerpo que tenga la especificidad de unión con HbC deseada.

Un anticuerpo anti-HbC se une normalmente a ambas formas glicada y no glicada de HbC con afinidad similar. Por ejemplo, un anticuerpo anti-HbC normalmente se une selectivamente a ambas HbC glicada y no glicada con una reactividad de unión en la que hay menos de una diferencia de reactividad de tres veces, normalmente menos de una diferencia de reactividad de dos veces, entre la unión a la HbC glicada frente a la no glicada.

Anticuerpos anti-HbE

La HbE tiene una lisina sustituida por ácido glutámico en la posición 26 de la cadena beta de hemoglobina. Una anticuerpo monoclonal anti-HbE de la invención es normalmente 4 veces o 5 veces más reactivo, a menudo al menos 10 veces más reactivos, con la HbE en comparación con la HbA. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal se une al epítipo mínimo ²²EVGGK²⁶. Dicho anticuerpo anti-HbE puede tener una especificidad de unión para ²²EVGGK²⁶ que depende de ²²E y en el que ²¹D, ²³V, y ²⁶K son importantes para la unión. El anticuerpo puede tener una especificidad de unión que es dependiente de E22 y en el que D21, V23 y K26 son importantes para la unión. El anticuerpo puede tener una especificidad de manera que la sustitución de la K en la posición 26 con S, T, A, R, Q o G conserva al menos el 50 %, normalmente al menos un 70 % o más de la actividad de unión. La sustitución de la K en la posición 26 con S, T, A, R o V puede conservar al menos el 50 %, normalmente al menos un 70 % o más, de la actividad de unión.

Un anticuerpo que se une a un epítipo mínimo de HbE, por ejemplo, el ²²EVGGK²⁶ puede unirse a variantes del epítipo mínimo de HbE que tiene la K en la posición 26, tal como un epítipo mínimo que comprende ²¹DEVGGK²⁶ o ²²EVX₄X₅K²⁶, donde X₄ y X₅ puede seleccionarse independientemente de entre los 20 aminoácidos comunes de origen natural, por ejemplo, las sustituciones conservadoras de G.

El anticuerpo normalmente es una IgG, por ejemplo, el anticuerpo puede tener un isotipo IgG1, IgG2 o IgG3. La región constante de la cadena ligera puede ser una cadena kappa. De manera alternativa la región constante de cadena ligera puede ser una cadena lambda.

Un anticuerpo anti-HbE de la invención se puede obtener, por ejemplo, utilizando el inmunógeno H5bis-KLH: H₂N-CYG-VTALWGKVNVDVGGK-CONH₂. El anticuerpo se puede producir contra un inmunógeno H5bis-KLH : H₂N-CYG-VTAL-WGKVNVDVGGK-CONH₂ con mezclas o inyecciones secuenciales del péptido, el antígeno HbE nativo, y el antígeno HbE desnaturalizado. Ejemplos de los inmunógenos peptídicos se han proporcionado en la Tabla 1. Los inmunógenos peptídicos se pueden utilizar en combinación entre ellos, sea con o sin la HbE nativa o desnaturalizada. Los protocolos de inmunización a modo de ejemplo se han proporcionado en la Tabla 2. Como se ha explicado anteriormente en la sección relativa a los anticuerpos anti-HbS, un experto en la técnica puede diseñar fácilmente otros péptidos inmunogénicos para obtener un anticuerpo que tenga la especificidad de unión a HbE deseada. El lector se remite de nuevo a la Tabla 1 para los ejemplos de otros inmunógenos peptídicos.

Un anticuerpo anti-HbE se une normalmente a ambas formas glicada y no glicada de HbE con una afinidad similar. Por ejemplo, un anticuerpo anti-HbE normalmente se une selectivamente a ambas HbE glicada y no glicada con una reactividad de unión en la que hay una diferencia de reactividad menor de tres veces, normalmente una diferencia de reactividad menor de dos veces, entre la unión la HbE glicada frente a la no glicada.

Anticuerpos anti-HbD

La HbD tiene una glutamina sustituida por un ácido glutámico en la posición 121 de la cadena beta de la hemoglobina. Un anticuerpo monoclonal anti-HbD de la invención es normalmente al menos 3 veces o más, más reactivo con HbD en comparación con la HbA. En algunas realizaciones el anticuerpo se une al epítipo mínimo ¹²¹QFTPP¹²⁵. El anticuerpo puede tener una especificidad de unión en la que los restos ¹¹⁹G, ¹²¹QF¹²², y ¹²¹PP¹²⁵ son importantes para la unión.

Un anticuerpo que se une al epítipo mínimo HbD, por ejemplo, ¹²¹QFTPP¹²⁵, se puede unir a variantes del epítipo mínimo de HbD que tenga la Q en la posición 121, tal como un epítipo mínimo que comprende ¹¹⁹GX₆QFX₇PP¹²⁵ o ¹²¹QFX₇PP¹²⁵, donde X₆ y X₇ se puede seleccionar independientemente de entre los 20 aminoácidos comunes de origen natural, por ejemplo, las sustituciones conservadoras de K y T, respectivamente.

El anticuerpo normalmente es una IgG, por ejemplo, el anticuerpo puede tener un isotipo IgG1 o IgG2. La región constante de la cadena ligera puede ser una cadena kappa. De manera alternativa la región constante de cadena ligera puede ser una cadena lambda.

Un anticuerpo anti-HbD de la invención se puede producir, por ejemplo, contra el inmunógeno H6-KLH : H₂N-CYGVLAHHFGKQFTPPVQAA-CONH₂, o contra mezclas de HbD nativa y/o desnaturalizada y H6-KLH : H₂N-CYGV-LAHHFGKQFTPPVQAA-CONH₂, o utilizando combinaciones de, o inyecciones secuenciales de, los distintos inmunógenos. Otros péptidos útiles para la obtención de un anticuerpo que tenga la especificidad de unión a HbD deseada serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

Un anticuerpo anti-HbD normalmente se une a ambas formas glicada y no glicada de HbD con afinidad similar. Por ejemplo, un anticuerpo anti-HbD normalmente se une selectivamente a ambas HbD glicada y no glicada con una reactividad de unión en la que hay una diferencia de reactividad menor de tres veces, normalmente una diferencia de reactividad menor de dos veces, entre la unión a la HbD glicada frente a la no glicada.

10 *Anticuerpos pan-reactivos*

También se desvelan en el presente documento anticuerpos pan-reactivos. Dichos anticuerpos se unen a múltiples formas de hemoglobina. Los anticuerpos pan-reactivos se pueden producir utilizando varios inmunógenos diferentes, incluyendo H5bis-KLH : H₂N-CYGV-TAL-WGKVN-DEVGGK-CONH₂ o H1-KLH : H₂N-VHLTPEEKSAVTALW-C-CONH₂. Dichos inmunógenos peptídicos se pueden inyectar o bien en una mezcla con HbA₀ nativa o desnaturalizada, o secuencialmente con la HbA₀ nativa o desnaturalizada. Como se entiende en la técnica, se puede utilizar cualquier número de inmunógenos de Hb para obtener un anticuerpo contra Hb que se una selectivamente a la HbA₀, así como variantes de Hb. Los anticuerpos pan-reactivos pueden ser monoclonales o policlonales. Los anticuerpos pan-reactivos también se pueden obtener por inmunización con hemoglobina nativa o desnaturalizada sin utilizar inmunógenos peptídicos.

20 Un anticuerpo pan-reactivo policlonal se puede unir a uno o más epítomos presentes en las siguientes regiones de alfa globina y beta globina: alfa globina ⁴⁹SHGSAQVKGHGKKVADALNAVAHVDDMPNALSALSDHLHAHKLRRVDPV⁹⁶, beta globina ¹⁵WGKVN-DEVGGEALG^{29, 45}FGDLSTP⁵¹, y ⁷⁶AHLDNLKGTFFAT⁸⁷.

Un anticuerpo pan-reactivo se puede unir al epítomo de la beta globina ⁹SAVTALWGKVVN²⁰. El anticuerpo se puede unir al epítomo de beta globina ¹¹VTALW¹⁵, ¹¹VT¹² y ¹⁴LW¹⁵ pueden ser importantes para la unión.

25 Un anticuerpo pan-reactivo se puede unir a los epítomos de alfa y beta globina que contienen las siguientes secuencias: un epítomo mínimo de beta globina ⁸KSAVTALWGKVVN²⁰, un epítomo mínimo de beta globina ⁵⁸PKVKAHGKKVLGAF⁷¹ y un epítomo mínimo de beta globina ⁸⁷TSELHCDKLHVDPENFR¹⁰⁴. Los restos ¹³ALWG¹⁶ pueden ser importantes para la unión.

30 El anticuerpo normalmente es una IgG, por ejemplo, el anticuerpo puede tener un isotipo IgG1, IgG2 o IgG3. La región constante de la cadena ligera puede ser una cadena kappa. De manera alternativa la región constante de cadena ligera puede ser una cadena lambda.

Un anticuerpo pan-reactivo desvelado en el presente documento es ampliamente reactivo contra la hemoglobina y se une a ambas formas glicada y no glicada de la hemoglobina A y variantes tales como HbS, HbS, HbD, y HbE.

35 Un anticuerpo pan-reactivo que se une a múltiples formas de hemoglobina se puede utilizar como un miembro de unión marcado que se une a todos los analitos, marcando de esta manera los analitos unidos. Por lo tanto, por ejemplo, se puede utilizar un anticuerpo policlonal pan-reactivo marcado que se une a los epítomos: alfa globina ⁴⁹SHGSAQVKGHGKKVADALNAVAHVDDMPNALSALSDHLHAHKLRRVDPV⁹⁶, beta globina ¹⁶GKVN-DEVGGEALG^{29, 46}FGDLSTP⁵¹, y ⁷⁸LDNLKGTFFAT⁸⁷ como anticuerpo de detección universal que se une a todos los analitos (formas de hemoglobina) que se están ensayando, marcando de esta manera los analitos unidos.

40 *Anticuerpos anti-HbA_{1c}*

Adicionalmente se desvelan en el presente documento los anticuerpos anti-HbA_{1c} que tienen especificidad por la hemoglobina glicada. Dichos anticuerpos se pueden producir utilizando un inmunógeno tal como GP3-KLH: 1-desoxifrufructopiranosil-HN-VHLTPEE-Hx-C-CONH₂. El anticuerpo puede ser una IgG, por ejemplo, y puede tener un isotipo IgG1, IgG2 o IgG3. La región constante de la cadena ligera puede ser una cadena lambda. De manera alternativa la región constante de cadena ligera puede ser una cadena kappa.

45 Un anticuerpo anti-HbA_{1c} como se desvela en el presente documento es altamente específico para la hemoglobina glicada, incluyendo HbA_{1c}, HbS_{1c}, HbD_{1c}, HbE_{1c}, y HbC_{1c}, y no reconoce las formas de hemoglobina no glicadas (es decir, el anticuerpo tiene al menos una afinidad 100 veces mayor por HbA_{1c}, HbS_{1c}, HbD_{1c}, HbE_{1c}, y HbC_{1c} que por las formas no glicadas). Dichos anticuerpos normalmente tienen una especificidad de unión por el péptido glicado del extremo N en el que tanto la valina 1 glicada como la histidina 2 son restos importantes para la unión.

50 Un anticuerpo monoclonal A_{1c} tienen una especificidad de unión en experimentos de unión competitiva de manera que el péptido GP3 glicado (1-desoxifrufructopiranosil-HN-VHLTPEE-Hx-C-CONH₂) compite por la unión con la HbA_{1c} nativa pero los péptidos no glicados tales como as RW1a (VHLTPEE-CONH) no.

Anticuerpos HbF y HbA₂

También se pueden ensayar la HbF y HbA₂ utilizando los procedimientos desvelados en el presente documento. Los anticuerpos que se unen selectivamente a HbF con respecto a HbA₀ u otras Hb proteicas, o a HbA₂ con respecto a HbA₀ u otras Hb proteicas, se puede obtener utilizando los inmunógenos que comprenden secuencias peptídicas que son específicas de HbF o secuencias que son específicas de HbA₂, ya que hay múltiples diferencias en las cadenas delta y gamma con respecto a la cadena beta de A₀.

Generación de anticuerpos

Los anticuerpos anti-hemoglobina de la invención se puede producir contra las hemoglobinas proteicas, o fragmentos, o se pueden producir de manera recombinante. Cualquiera de las técnicas bien conocidas en la técnica se puede utilizar para determinar la especificidad de unión del anticuerpo. Véase, por ejemplo, Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988) para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayos que se pueden utilizar para determinar la inmunorreactividad específica de un anticuerpo.

Un anticuerpo, tal como, por ejemplo, un anticuerpo contra la hemoglobina que se une a distintas formas de hemoglobinas, un anticuerpo contra la hemoglobina específico para una variante, o un anticuerpo contra la hemoglobina específico para una hemoglobina glicada, puede ser un anticuerpo policlonal. Por ejemplo, un anticuerpo específico para una variante de hemoglobina puede ser un anticuerpo policlonal mono específico purificado por afinidad. Los procedimientos para la preparación de anticuerpos policlonales son conocidos por el experto (por ejemplo, Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory manual* (1988); *Methods in Immunology*). Los anticuerpos policlonales se pueden producir en un mamífero mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante.

Un anticuerpo que se une a múltiples formas de hemoglobina, un anticuerpo que es específico de una variante de hemoglobina (y la variante de hemoglobina glicada), o un anticuerpo que es específico de la hemoglobina glicada, puede ser un anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando procedimientos de hibridoma, tal como los que se describen por Kohler & Milstein, *Nature* 256:495 (1975). En un procedimiento de hibridoma, se inmuniza un ratón, rata, conejo, u otro animal huésped apropiado con un agente inmunizante para dar lugar a linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. De manera alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

Como se ha establecido anteriormente, los anticuerpos de la invención se pueden generar utilizando cualquiera de los inmunógenos y protocolos de inmunización. El inmunógeno puede ser un péptido que se administra en combinación con una hemoglobina proteica nativa o desnaturalizada. Como se entiende en la técnica, un inmunógeno se puede administrar múltiples veces. En los casos en los que se emplea una combinación, la combinación de antígenos se puede administrar simultáneamente, o secuencialmente, en cualquier orden. Un inmunógeno peptídico puede ser un conjugado KLH, sin embargo, se pueden utilizar otros vehículos proteicos distintos de KLH, por ejemplo, se pueden utilizar conjugados con BSA.

Condiciones de ensayo utilizando los anticuerpos

La hemoglobina A_{1c}, variantes de hemoglobina, y hemoglobina total se pueden medir mediante una variedad de formatos de inmunoensayos. Un ejemplo, es el formato sándwich, en el que un anticuerpo específico para el analito se adhiere a la perla de fase sólida, y la detección se consigue interrogando a las perlas con uno o más anticuerpos contra las especies de hemoglobina. Se puede utilizar un anticuerpo universal que se una a todas las especies de hemoglobina para la interrogación, pero también se pueden utilizar dos o más anticuerpos de detección. Un ejemplo se muestra en la FIG. 1, en el que se utilizan anticuerpos individuales que son específicos para la hemoglobina total, HbA_{1c} y las cuatro especies de variación de la hemoglobina más prevalentes HbS, HbC, HbE y HbD, respectivamente, se unen a subpoblaciones distintas de perlas, mientras que se utiliza un anticuerpo universal que se une a todas las especies de hemoglobina y que alberga ficoeritrina (PE) como marcador. En un formato de ensayo sándwich, la cantidad de anticuerpo para cada ensayo se selecciona de tal manera que el analito (la forma particular de hemoglobina a la que se dirige el ensayo) está en exceso, de manera que los anticuerpos son los reactivos limitantes de las reacciones de unión. La competición entre el anticuerpo para la hemoglobina total y los anticuerpos para las hemoglobinas individuales, por ejemplo, está por lo tanto minimizada. Ajustando los parámetros del ensayo y la selección de anticuerpos apropiados de la manera de la experiencia de la técnica, sin embargo, un formato de ensayo competitivo también se puede utilizar para la detección múltiple de las especies de hemoglobina.

Aunque se puede utilizar un ensayo múltiple en muestras de sangre de mamífero en general, el ensayo tiene un valor particular para muestras de sangre humana. Las muestras de sangre se preparan para el ensayo por lisis de las células y dilución del lisado hasta una concentración adecuada para el inmunoensayo. Cada una de estas etapas se llevan a cabo mediante procedimientos conocidos en la técnica. Se puede conseguir la dilución con agua, soluciones que contienen saponina, o cualquier otro diluyente que no afecte a las hemoglobinas o su actividad de unión inmunológica, y el grado de dilución puede variar ampliamente. En la mayoría de los casos, la dilución estará en el intervalo de 1:25 a 1:3000. Las hemoglobinas del lisado pueden desnaturalizarse antes o después de la dilución del lisado y utilizarse en el ensayo, o se puede utilizar el lisado sin desnaturalización de las hemoglobinas.

En la mayoría de los casos, se prefiere la desnaturalización, y se puede llevar a cabo por procedimientos conocidos en la técnica.

Los niveles de HbA_{1c} y cada una de las variantes se expresan cada una preferentemente como un porcentaje de la hemoglobina total de la muestra. Para las determinaciones de los grados de glicación en presencia de una variante de hemoglobina, se desvelan tres opciones en el presente documento. Una opción, que es compatible con el procedimiento aceptado actualmente, es la determinación del nivel de HbA_{1c} por el resultado solamente del a perla HbA_{1c}, normalizado a la hemoglobina total. La segunda opción es la determinación de la glicación de hemoglobina total añadiendo un porcentaje de la forma glicada de la variante con respecto al porcentaje de HbA_{1c}. La tercera opción, que es útil en el caso en el que la determinación de HbA_{1c} está afectada adversamente por la presencia de la variante, es ajustar el porcentaje de HbA_{1c} así medido por un factor de corrección que es una función del nivel detectado de la variante. La función se puede determinar empíricamente por una relación que se puede determinar independientemente por diferentes ensayos, incluyendo ensayos no múltiplex. El factor de corrección puede ser uno que se aplica a la concentración de HbA_{1c} después de normalizar la concentración con respecto a la hemoglobina total, o la concentración antes de la normalización.

Para ilustrar la corrección del valor de HbA_{1c}, se llevaron a cabo ensayos en muestras de diez pacientes, utilizando tanto el ensayo basado en perlas (BioPlex 2200 de Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA) y un ensayo HPLC (Variant™ II de Bio-Rad Laboratories, Inc.), determinando ambos ensayos el porcentaje de HbA_{1c} en función del aumento de porcentaje de HbC. Los resultados se muestran en la Tabla 3 y la FIG. 2, en la que la "Diferencia de la relación" = (% de A_{1c} Variant II - % A_{1c} BioPlex 2200) / (% A_{1c} Variant II).

Tabla 3

ID del Paciente	% HbC	----- % A _{1c} -----		Relación de la diferencia	Valor BioPlex ajustado	Diferencia con la diana	
		BioPlex 2200	Variant II (Diana)			Ajustado	No ajustado
PT 200	31,8	6,06	5,9	-0,03	5,73	0,17	-0,16
PT 219	32,1	6,30	5,8	-0,09	5,98	-0,18	-0,50
PT 265	33,7	5,71	5,4	-0,06	5,37	0,03	-0,31
PT 622	34,1	6,20	5,9	-0,05	5,87	0,03	-0,30
PT 658	33,9	5,92	5,9	0,00	5,59	0,31	-0,02
PT 667	33,5	6,00	5,8	-0,03	5,67	0,13	-0,20
PT m832	32,1	6,14	6,1	-0,01	5,81	0,29	-0,04
PT m837	37,6	5,80	5,5	-0,05	5,47	0,03	-0,30
PT m908	39,2	5,37	4,6	-0,17	5,03	-0,43	-0,77
PT m923	41,1	5,53	4,8	-0,15	5,19	-0,39	-0,73
Promedio de la diferencia →						0,00	-0,33

Aunque se pueden utilizar distintos modelos matemáticos se pueden utilizar para cuantificar la relación del porcentaje de diferencia de HbA_{1c} en función del porcentaje de hemoglobina C (o cualquier variante de hemoglobina), el modelo matemático utilizado en este ejemplo es un modelo de regresión lineal simple. Utilizando este modelo, los valores obtenidos del inmunoensayo BioPlex 2200 se puede corregir para dar lugar a un resultado comparable al procedimiento de referencia. Esto se demuestra por el promedio de diferencia del procedimiento Variante II. En la Tabla 3 y la FIG. 2, el promedio de diferencia es cero para los valores de HbA_{1c} ajustados en comparación con -0,33 para los valores no ajustados correspondientes. El valor de HbA_{1c} corregido que se muestra en la tabla proporciona una mejor estimación del índice glicémico del individuo.

El inmunoensayo BioPlex 2200 basado en perlas que se utilizó para la obtención de los datos de la Tabla 3 y la FIG. 2 utiliza un anticuerpo que se une a HbA_{1c} y todas las variantes de hemoglobina incluyendo HbS, HbC, HbD y HbE. Todas las variantes glicadas y HbA₀ se unen con aproximadamente la misma afinidad y avidéz por el anticuerpo. El resultado del inmunoensayo representa por tanto la hemoglobina total glicada, en el caso de la variante heterocigota de hemoglobina AS, es el valor combinado que incluye tanto la especie HbA_{1c} como la HbS_{1c}. En los individuos que presentan un fenotipo de variante de hemoglobina, la proporción de hemoglobina glicada correspondiente a la variante proporciona una mejor medición del estado glicémico. El porcentaje de HbS_{1c} en la muestra se obtiene multiplicando el porcentaje total de HbA_{1c} más el valor de HbS_{1c} por la proporción de HbS en la muestra: Por ejemplo, para una muestra del paciente con un valor de hemoglobina glicada total del 5,54 % (que consiste en HbA_{1c} y HbS_{1c}), multiplicando este valor por la proporción de HbS en la muestra de 38,8 % da lugar a un valor para HbS_{1c} de 2,14 %. El resto del material glicado es HbA_{1c} al 3,4 %. Esto de nuevo es un modelo matemático; se pueden utilizar modelos matemáticos más sofisticados para proporcionar resultados más precisos.

Las perlas que proporcionan las superficies en las que se producen las reacciones de unión se pueden formar por cualquier material que sea inerte a los materiales de ensayo y a los componentes de la propia muestra, y que es sólido e insoluble en la muestra y en cualquiera de los diferentes disolventes o vehículos utilizados en el ensayo. Se prefieren polímeros, y las perlas son preferentemente micropartículas. El polimérico puede ser de cualquier material que pueda formarse como una micropartícula y sea capaz de unirse al anticuerpo en una región del anticuerpo que no interfiera con las regiones de unión al antígeno del anticuerpo. En los casos en los que se utilizan marcadores fluorescentes, los polímeros preferidos son también los que producen al menos un nivel mínimo de autofluorescencia. Ejemplos de polímeros adecuados son poliésteres, poliéteres, poliolefinas, óxidos de polialquileno, poliamidas, poliuretanos, polisacáridos, celulosas, y poliisoprenos. La reticulación es útil en muchos polímeros impartiendo integridad estructural y rigidez a la micropartícula. También se pueden utilizar perlas magnéticas.

La unión de los anticuerpos a las superficies de las perlas se puede conseguir por atracción electrostática, interacción de afinidad específica, interacción hidrófoba, o enlace covalente. Se prefiere el enlace covalente. Los grupos funcionales para el enlace covalente se pueden incorporar en la estructura polimérica por medios convencionales, tal como el uso de monómero que contienen grupos funcionales, sea como el monómero solo o como un co-monómero. Ejemplos de grupos funcionales adecuados son los grupos amina(-NH₂), grupos amonio (-NH₃⁺ o NR₃⁺), grupos hidroxilo (-OH), grupos de ácido carboxílico (-COOH), y grupos isocianato (-NCO). Los monómeros útiles para la introducción de grupos de ácido carboxílico en las poliolefinas, por ejemplo, son ácido acrílico y ácido metacrílico. Los grupos de unión también pueden utilizarse para aumentar la densidad de los anticuerpos sobre la superficie de la fase sólida y para disminuir los impedimentos estéricos para aumentar el intervalo y sensibilidad del ensayo. Los ejemplos de grupos de unión útiles adecuados son polilisina, ácido poliaspártico, ácido poliglutámico y poliarginina.

El intervalo de tamaño de las perlas puede variar y no hay intervalos de tamaño particulares críticos. En la mayoría de los casos, el intervalo de tamaño agregado de las perlas se basa en el intervalo de desde 0,3 micrómetros a 100 micrómetros de diámetro, y preferentemente en el intervalo de desde 0,5 micrómetros a 40 micrómetros.

El multiplexado con el uso de perlas se consigue asignando las perlas a dos o más grupos, a lo que también se hace referencia en el presente documento como o conjuntos o subpoblaciones de perlas. Cada grupo tendrá fijado en él un anticuerpo seleccionado para o una variante de hemoglobina, una variante glicada, HbA_{1c}, o hemoglobina total, y se podrán separar o al menos distinguirse de los otros grupos por un "parámetro de diferenciación". El "parámetro de diferenciación" puede ser cualquier característica distinguible que permita separar la detección del resultado del ensayo en un grupo del de los otros grupos. Un ejemplo de un parámetro de diferenciación es el tamaño de la partícula, teniendo cada grupo un intervalo de tamaño no se solapa con los intervalos de tamaño de los otros grupos. La anchura de los intervalos de tamaño y el espacio entre los diámetros medios de los intervalos de tamaño diferentes se selecciona para permitir la diferenciación de los grupos por citometría de flujo de acuerdo con el tamaño, y será fácilmente evidente para los expertos en el uso y la instrumentación para la citometría de flujo. En la presente memoria descriptiva, la expresión "diámetro medio" se refiere a un número medio del diámetro. En la mayoría de los casos la anchura del intervalo de tamaño es uno con un CV de aproximadamente el 65 % o menos del diámetro medio, donde CV es el coeficiente de variación y se define como la desviación típica del diámetro de la partícula dividido por las veces del 100 por ciento del diámetro medio de la partícula. El espaciado mínimo entre los diámetros medios entre los distintos intervalos de tamaño puede variar dependiendo de la distribución de tamaño, la facilidad de segregar las perlas por tamaño con el fin de enganchar diferentes anticuerpos, y el tipo y sensibilidad del equipamiento de citometría de flujo. En la mayoría de los casos, los mejores resultados se alcanzarán cuando los diámetros medios de diferentes intervalos de tamaño se espacian por al menos aproximadamente un 6 % del diámetro medio de uno de los intervalos de tamaño, preferentemente aproximadamente al menos un 8 % del diámetro medio de uno de los intervalos de tamaño y más preferentemente al menos aproximadamente un 10 % de diámetro medio de uno de los intervalos de tamaño. Otra relación de anchura del intervalo de tamaño preferida es en la que la desviación típica de los diámetros de partícula en cada intervalo de tamaño es menor de un tercio de la separación de los diámetros medios de intervalos de tamaño adyacentes.

Otro ejemplo de un parámetro de diferenciación que se puede utilizar para distinguir entre los distintos grupos de perlas es la fluorescencia. La diferenciación por fluorescencia se consigue incorporando materiales fluorescentes en las perlas, teniendo los materiales diferentes espectros de emisión para cada grupo de perlas y siendo distinguible con esta base.

Se puede utilizar la fluorescencia por lo tanto como parámetro de diferenciación y como un medio para detectar que se ha producido la unión en los ensayos llevados a cabo en las perlas. Esto último se puede conseguir por marcadores fluorescentes que sirve como indicadores del ensayo. Por lo tanto, mientras que los grupos individuales se pueden distinguir emitiendo diferentes espectros de emisión, y los espectros de emisión utilizados con fines de diferenciación de grupos pueden diferenciarse en sí mismos de los espectros de emisión de los indicadores del ensayo. Un ejemplo de una sustancia fluorescente que se puede utilizar como un parámetro de diferenciación es fluoresceína y un ejemplo de una sustancia que se puede utilizar para la detección del ensayo es la ficoeritrina. Los diferentes grupos de perlas se pueden distinguir entre ellas marcándose con diferentes concentraciones de fluoresceína. Los diferentes grupos de perlas se pueden distinguir utilizando materiales fluorescentes que tienen diferentes intensidades de fluorescencia o que pueden emitir fluorescencia a diferentes longitudes de onda. Los

colorantes también se pueden utilizar en combinaciones para producir una pluralidad de emisiones fluorescentes a diferentes longitudes de onda, y la diferencia de longitudes de onda se puede utilizar tanto como el parámetro de diferenciación como de medio para distinguir el parámetro de diferenciación del indicador del ensayo.

5 Otros ejemplos más de parámetros de diferenciación son la dispersión de la luz, la emisión de luz, o combinaciones de dispersión de luz y emisión. La dispersión de la luz en un ángulo lateral varía con el tamaño de la partícula, la granularidad, la absorbancia y la rugosidad de la superficie, mientras que la dispersión de la luz en un ángulo directo está afectada principalmente por el tamaño y el índice de refracción. Cualquiera de estas cualidades se puede, por lo tanto, utilizar como el parámetro de diferenciación.

10 De acuerdo con un medio de diferenciación, las perlas tendrán dos o más fluorocromos incorporados con ellos de manera que cada perla de la matriz tendrá al menos tres parámetros distinguibles asociados con él, es decir, la dispersión lateral junto con las emisiones fluorescentes a dos longitudes de onda diferentes. Un fluorocromo rojo tal como Cy5 se puede utilizar, por lo tanto, junto con un fluorocromo naranja tal como Cy5.5. Se pueden utilizar fluorocromos adicionales para expandir adicionalmente el sistema. Cada perla puede contener, por lo tanto, una pluralidad de colorantes fluorescentes con longitudes de onda variables.

15 Otro ejemplo más de un parámetro de diferenciación que se puede utilizar para distinguir entre distintos grupos de perlas es la absorbancia. Cuando se aplica la luz a las perlas la absorbancia de la luz por las perlas se indica principalmente por la fuerza de la dispersión de luz lateralmente (ángulo lateral) mientras que la fuerza de la dispersión de la luz directa relativamente no está afectada. En consecuencia, la diferencia de la absorbancia entre distintos tintes coloreados asociados con las perlas se determina observando las diferencias en la fuerza de la
20 dispersión de la luz lateralmente.

Un ejemplo adicional más de un parámetro de diferenciación que se puede utilizar para distinguir entre los distintos grupos de perlas es el número de perlas de cada grupo. El número de perlas de cada grupo en un ensayo varía de manera conocida y se determina el recuento de perlas que tienen distintas respuestas en el ensayo. Las distintas respuestas se asocian con un ensayo particular por el número de perlas que tienen cada respuesta.

25 Como ilustran los ejemplos anteriores, se puede utilizar una amplia matriz de parámetros o características como parámetros de diferenciación para distinguir las perlas de un grupo de los de otro. Los parámetros de diferenciación pueden resultar del tamaño, composición, características físicas que afectan la dispersión de la luz, colorantes fluorescentes o coloreados que dan lugar a diferentes espectros de emisión y/o características de dispersión a las perlas, o diferentes concentraciones de uno o más colorantes fluorescentes. Cuando el parámetro de diferenciación
30 es un colorante fluorescente o de olor, puede revestir la superficie de las perlas, estar embebido en las perlas, o unido a las moléculas del material de la perla. Por lo tanto, se pueden fabricar perlas fluorescentes combinando el material polimérico con el colorante fluorescente, o impregnando las perlas con el colorante. Las perlas con los colorantes ya incorporados están disponibles en el mercado, a partir de suministradores tales como Spherotech, Inc. (Libertyville, Illinois, USA) y Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oregón, USA). Una lista de vendedores de productos
35 citométricos de flujo se pueden encontrar en internet, por ejemplo, en el sitio de internet molbio.princeton.edu/facs/FCMsites.html.

La detección y diferenciación se puede llevar a cabo por citometría de flujo. Los procedimientos y la instrumentación para la citometría de flujo se conocen en la técnica. La citometría de flujo en general reside en el paso de una
40 suspensión de perlas o micropartículas como una corriente que pasa un rayo de luz y unos sensores electro-ópticos, de una manera que solo pasa una partícula a la vez a través de la región. Cuando pasa cada particular por esta región, el rayo de luz se altera por la presencia de la partícula, y la luz dispersada y fluorescente se detecta. Las señales ópticas se utilizan por el instrumento para identificar el subgrupo al que pertenece cada partícula, junto con la presencia y cantidad del marcador, de manera que se consiguen los resultados del ensayo individual. Las descripciones de los instrumentos y procedimientos para la citometría de flujo se encuentran en la bibliografía.
45 Ejemplos son McHugh, "Flow Microsphere Immunoassay for the Quantitative and Simultaneous Detection of Multiple Soluble Analytes," *Methods in Cell Biology* 42, Part B (Academic Press, 1994); McHugh y col., "Microsphere-Based Fluorescence Immunoassays Using Flow Cytometry Instrumentation," *Clinical Flow Cytometry*, Bauer, K.D., y col., eds. (Baltimore, Maryland, USA: Williams and Williams, 1993), pp. 535-544; Lindmo y col., "Immunoassay Using Mixtures of Two Particle Types of Different Affinity," *J. Immunol. Meth.* 126: 183-189 (1990); McHugh, "Flow Cytometry and the Application of Microsphere-Based Fluorescence Immunoassays," *Immunochemica* 5: 116 (1991);
50 Horan y col., "Fluid Phase Particle Fluorescence Analysis: Rheumatoid Factor Specificity Evaluated by Laser Flow Cytometry," *Immunoassays in the Clinical Laboratory*, 185-189 (Liss 1979); Wilson y col., "A New Microsphere-Based Immunofluorescence Assay Using Flow Cytometry," *J. Immunol. Meth.* 107: 225-230 (1988); Fulwyler y col., "Flow Microsphere Immunoassay for the Quantitative and Simultaneous Detection of Multiple Soluble Analytes,"
55 *Meth. Cell Biol.* 33: 613-629 (1990); Coulter Electronics Inc., Patente de Reino Unido N° 1.561.042 (publicada el 13 de febrero de 1980); y Steinkamp y col., *Review of Scientific Instruments* 44(9): 1301-1310 (1973).

Ejemplo 1

Este ejemplo presenta las actividades de unión de seis candidatos a anticuerpos contra la hemoglobina. Los seis anticuerpos son:

19E10-E7 (específico de HbS) 7B3-2C3-1G10 (específico de HbD)
 12C8-A11 (específico de HbC) 13G7-E8-3H3 (específico de HbA_{1c})
 4A10-2D6-2G8 (específico de HbE) 3E5- DLE10-3A3 (pan-reactivo)

El 19E10-E7 se une al epítipo mínimo de beta globina ⁵PVEKSAVT¹². ⁵PVE⁷ y A¹⁰ son importantes para la unión. L³ y T⁴ también contribuyen a la actividad de unión. Los experimentos de mapeo de epítipo adicionales muestran que V⁶ se puede sustituir por I sin pérdida de actividad de unión.

5 12C8-A11 se une al epítipo mínimo de beta globina ⁴TPKEKSAVT¹². T⁴ y K⁶ son importantes para la unión. L³ también contribuye a la unión. Los experimentos de mapeo de epítipo adicionales muestran que K⁶ puede sustituirse con R sin reducir la actividad de unión.

10 4A10-2D6-2G8 se une al epítipo mínimo de beta globina ²²EVGGK²⁶. ²²EV²³ y K²⁶ son importantes para la unión. D²¹ también contribuye a la unión. Los experimentos de mapeo de epítipo adicionales mostraban que K²⁶ se puede sustituir con S o T sin pérdida de actividad de unión.

7B3-2C3-1G10 se une al epítipo mínimo de beta globina ¹²¹QFTPP¹²⁵. G¹¹⁹ también contribuyen a la unión.

15 Las cinéticas de unión se analizaron utilizando el ProteOn XPR36 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) por interacciones proteína-proteína. Los diferentes anticuerpos (10 µg de cada) se acoplaron por la amina al chip sensor de manera que se inmovilizaba un anticuerpo por canal. Se empleó el antígeno en el intervalo de desde 200 a 13 nM. Los resultados del análisis de cinética se resumen en la Tabla 4 posterior.

20 Cada anticuerpo tiene una alta afinidad por su hemoglobina específica. El anticuerpo pan-reactivo también tiene buenas constantes de afinidad para los diferentes antígenos, pero menor que la constante de afinidad presentada por los anticuerpos contra variantes específicas por sus antígenos respectivos. Excepto para 19E10-E7, todos los anticuerpos contra variantes no se unían a HbA₀, de manera que las constantes de afinidad eran esencialmente cero. Para el anticuerpo 19E10-E7 anti HbS, se observó un bajo nivel de unión a HbA₀, con una constante de afinidad de 6,5 10⁻⁷ M, que es 2 log menor que la constante de afinidad para HbS.

Tabla 4

Análisis cinéticos para 6 anticuerpos monoclonales específicos contra la hemoglobina y variantes de hemoglobina

19E10-E7	k_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
HbS	7,6 10 ⁴	6,3 10 ⁻⁴	8,3 10 ⁻⁹
12C8-A11	k_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
HbC	7,3 10 ⁴	4,5 10 ⁻⁴	6,1 10 ⁻⁹
4A10-2D6	k_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
HbE	7,1 10 ⁴	6,2 10 ⁻⁵	8,7 10 ⁻¹⁰
7B3-2C3	k_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
HbD	1,4 10 ⁵	1,1 10 ⁻³	7,4 10 ⁻⁹
13G7-E8	k_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
HbA _{1c}	1,2 10 ⁴	2,3 10 ⁻⁵	1,9 10 ⁻⁹
3E5-DLE10	k_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
HbS	3,9 10 ⁴	7,9 10 ⁻⁴	2,0 10 ⁻⁸
HbE	2,9 10 ⁴	4,4 10 ⁻⁴	1,5 10 ⁻⁸
HbD	3,4 10 ⁴	1,0 10 ⁻³	3,0 10 ⁻⁸
HbA _{1c}	3,7 10 ⁴	9,4 10 ⁻⁴	2,5 10 ⁻⁸
HbC	4,5 10 ⁴	7,4 10 ⁻⁴	1,6 10 ⁻⁸
HbA ₀	1,4 10 ⁴	3,4 10 ⁻³	2,4 10 ⁻⁷

Ejemplo 2

25 Este ejemplo demuestra que la medición de la hemoglobina A_{1c} y las variantes de hemoglobina proteica como porcentajes de la hemoglobina total utilizando un inmunoensayo sándwich. Los inmunorreactivos de las perlas de captura de la fase sólida se desarrollaron utilizando los seis anticuerpos monoclonales específicos HbA₀, HbA_{1c}, HbS, HbC, HbE, y HbD descritos en el Ejemplo 1.

30 Los anticuerpos de cada uno de los seis antígenos diana se acoplaron covalentemente a perlas paramagnéticas. Cada perla se coloreó para que contuviera una señal fluorescente específica que era única para cada anticuerpo, para permitir la diferenciación posterior en un detector por citometría de flujo. Las perlas acopladas a los seis

anticuerpos se mezclaron para crear un reactivo de perlas múltiplex. Se preparó un reactivo de anticuerpo de detección utilizando un anticuerpo policlonal marcado con ficoeritrina con una reactividad para todas las especies de hemoglobina. Un diagrama de las distintas perlas y las especies unidas a cada una en el ensayo se muestra en la FIG. 1.

5 El ensayo se llevó a cabo añadiendo muestras de sangre entera y los calibradores (5 µl) a una solución de desnaturalizante tamponado (10 µl), para exponer todos los epítomos de las especies de hemoglobina presentes en las muestras con el fin de hacerlos disponibles para la unión con los anticuerpos de la fase sólida. Después de la desnaturalización durante 10 min a 37 grados Celsius, el reactivo de perlas (250 µl) se añadieron a las muestras, seguido por una incubación adicional durante 20 minutos a 37 grados Celsius. La mezcla de reacción se lavó cuatro veces con solución salina tampón fosfato que contenía un 0,1 % de detergente Tween-20 (PBST, 100 µl cada uno) para retirar todas las proteínas no unidas de la muestra, dejando las perlas con sus hemoglobinas diana unidas. Las perlas se re-suspendieron en PBST que contenía el reactivo de anticuerpo marcado con ficoeritrina (25 µl), y se incubó durante 20 min a 37 grados Celsius.

15 Después de lavarlo cuatro veces con PBST (100 µl cada uno), las perlas se re-suspendieron en PBST y se procesaron mediante el detector de citometría de flujo Luminex para interrogar las perlas en cuanto a la unión de las especies de inmunoglobulina individuales presentes en las muestras. Por ejemplo, las muestras de individuos homocigotos AA o hemoglobina presentan una señal de perlas HbA_{1c} y HbA₀, y las muestras de los individuos heterocigotos de la variante de hemoglobina presentan una señal de HbA₀, HbA_{1c} y las perlas de la variante específica de hemoglobina. La señal fluorescente derivada de la ficoeritrina de cada perla se mide para las muestras y los calibradores. Se construyó una curva de calibración para cada analito de hemoglobina utilizando la señal de la perla y la dosis conocida de los calibradores respectivos. La concentración de los analitos de hemoglobina se determinó a partir de su señal y la respuesta a la dosis establecida en la curva de calibración. El porcentaje de HbA_{1c} y el porcentaje de variante de hemoglobina, si existe, en las muestras se determinó dividiendo la concentración de hemoglobina A_{1c} o variante de hemoglobina proteica por la concentración de HbA₀, cada una derivada de su perla respectiva. En el caso de muestras que contengan la variante de hemoglobina heterocigota (tal como HbAS, por ejemplo, el porcentaje del valor de A_{1c} derivado de la relación de la concentración de A_{1c} con respecto a la de HbA₀ se ajustó cuando era necesario utilizando la concentración de la variante de hemoglobina en la muestra, para proporcionar un valor que refleje mejor el verdadero índice glicémico del individuo.

30 LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> Bio-Rad Laboratories, Inc.
- <120> Inmunoensayos múltiplex para Hemoglobina, variantes de hemoglobina, y formas glicadas
- <130> 160218ep
- <150> EP 10832004.5
- <151> 09-11-2010
- 40 <150> US 61/262.488
- <151> 18-11-2010
- <150> US 12/941.738
- <151> 08-11-2010
- 45 <160> 46
- <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- 50 <210> 1
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 55 <220>
- <223> anticuerpo monoclonal anti-epítomo mínimo de la variante sintética HbC de hemoglobina
- <400> 1

Thr Pro Lys Glu Lys Ser Ala Val Thr
1 5

60

ES 2 665 958 T3

5 <210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> anticuerpo monoclonal anti-epítopo mínimo de la variante sintética HbC de hemoglobina

10 <220>
<221 > variante
<222> (3)...(3)
<223> Xaa = cualquier aminoácido de origen natural

15 <400> 2

Leu Thr Xaa Lys Glu
1 5

20 <210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> anticuerpo monoclonal anti-epítopo mínimo de la variante sintética HbS de hemoglobina

25 <400> 3

Leu Thr Pro Val Glu Lys Ser Ala Val Thr
1 5 10

30 <210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> anticuerpo monoclonal anti-epítopo mínimo de la variante sintética HbS de hemoglobina

40 <220>
<221 > variante
<222> (4)...(5)
<223> Xaa = cualquier aminoácido de origen natural

<400> 4

Pro Val Glu Xaa Xaa Ala
1 5

45 <210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> anticuerpo monoclonal anti-epítopo mínimo de la variante sintética HbC de hemoglobina

55 <220>
<221 > variante
<222> (6)...(7)
<223> Xaa = cualquier aminoácido de origen natural

60 <400> 5

ES 2 665 958 T3

Leu Thr Pro Val Glu Xaa Xaa Ala
1 5

5 <210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> anticuerpo monoclonal anti-epítopo mínimo de la variante sintética HbE de hemoglobina
<400> 6

Glu Val Gly Gly Lys
1 5

15 <210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> anticuerpo monoclonal anti-epítopo mínimo de la variante sintética HbE de hemoglobina
<400> 7

Asp Glu Val Gly Gly Lys
1 5

25 <210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> anticuerpo monoclonal anti-epítopo mínimo de la variante sintética HbD de hemoglobina
35 <400> 8

Gln Phe Thr Pro Pro
1 5

40 <210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> anticuerpo monoclonal anti-epítopo mínimo de la variante sintética HbD de hemoglobina

<220>
<221> variante
<222> (2)...(5)
50 <223> Xaa = cualquier aminoácido de origen natural
<400> 9

Gly Xaa Gln Phe Xaa Pro Pro
1 5

55 <210> 10

ES 2 665 958 T3

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> anticuerpo monoclonal anti-epitopo mínimo de la variante sintética HbD de hemoglobina

<220>
 <221 > variante
 10 <222> (3)...(3)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido de origen natural

<400> 10

Gln Phe Xaa Pro Pro
 1 5

15 <210> 11
 <211> 50
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> anticuerpo policlonal sintético pan-reactivo anti-epitopo de alfa globina

25 <400> 11

Ser His Gly Ser Ala Gln Val Lys Gly His Gly Lys Lys Val Ala Asp
 1 5 10 15
 Ala Leu Thr Asn Ala Val Ala His Val Asp Asp Met Pro Asn Ala Leu
 20 25 30
 Ser Ala Leu Ser Asp His Leu His Ala His Lys Leu Arg Arg Val Asp
 35 40 45
 Pro Val
 50

30 <210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 35 <223> anticuerpo policlonal sintético pan-reactivo anti-epitopo de beta globina

<400> 12

Trp Gly Lys Val Asn Val Asp Glu Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly
 1 5 10 15

40 <210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> anticuerpo policlonal sintético pan-reactivo anti-epitopo de beta globina

<400> 13

50 Phe Gly Asp Leu Ser Thr Pro
 1 5

ES 2 665 958 T3

Ala Leu Trp Gly
1

5 <210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> anticuerpo policlonal o monoclonal sintético pan-reactivo anti-epítipo mínimo de beta globina

15 <220>
<221> variante
<222> (3)...(3)
<223> Xaa = cualquier aminoácido de origen natural

<400> 19

Val Thr Xaa Leu Trp
1 5

20 <210> 20
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> anticuerpo sintético anti-epítipo de beta globina

<400> 20

Pro Lys Val Lys Ala His Gly Lys Lys Val Leu Gly Ala Phe
1 5 10

30 <210> 21
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> anticuerpo sintético anti-epítipo de beta globina

40 <400> 21

Thr Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys Leu His Val Asp Pro Glu Asn
1 5 10 15
Phe Arg

45 <210> 22
<211> 146
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

50 <220>
<223> cadena beta de hemoglobina humana, cadena beta de globina

<400> 22

ES 2 665 958 T3

```

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

```

Tyr His
145

5 <210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido H1 de hemoglobina sintética

15 <220>
<221 > AMIDACIÓN
<222> (16)...(16)
<223> cisteinamida

<400> 23

```

Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Ser Ala Val Thr Ala Leu Trp Cys
 1                    5                      10                15

```

20 <210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> péptido H2 de hemoglobina sintética

30 <220>
<221 > AMIDACIÓN
<222> (16)...(16)
<223> cisteinamida

<400> 24

```

Val His Leu Thr Pro Glu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Ser Trp Cys
 1                    5                      10                15

```

35 <210> 25

ES 2 665 958 T3

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> péptido H2 bis de hemoglobina sintética

<220>
 <221 > AMIDACIÓN
 <222> (16)...(16)
 <223> cisteinamida

10

<400> 25

Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Ser Ala Ser Thr Ala Ser Trp Cys
 1 5 10 15

15

<210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> péptido H3 de la variante sintética HbS de hemoglobina

25

<220>
 <221 > AMIDACIÓN
 <222> (16)...(16)
 <223> cisteinamida

30

<400> 26

Val His Leu Thr Pro Val Glu Lys Ser Ala Val Thr Ala Leu Trp Cys
 1 5 10 15

35

<210> 27
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> péptido H4 de la variante sintética HbC de hemoglobina

<220>
 <221 > AMIDACIÓN
 <222> (16)...(16)
 <223> cisteinamida

45

<400> 27

Val His Leu Thr Pro Lys Glu Lys Ser Ala Val Thr Ala Leu Trp Cys
 1 5 10 15

50

<210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> péptido H5 de la variante sintética HbE de hemoglobina

ES 2 665 958 T3

<220>
 <221 > MOD_RES
 <222> (1)...(1)
 <223> Asn modificado por CYG
 5

<220>
 <221 > AMIDACIÓN
 <222> (15)...(15)
 <223> valinamida
 10

Asn Val Asp Glu Val Gly Gly Lys Ala Leu Gly Arg Leu Leu Val
1 5 10 15

15 <210> 29
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> péptido H5 bis de la variante sintética HbE de hemoglobina

25 <220>
 <221 > MOD_RES
 <222> (1)...(1)
 <223> Val modificada por CYG

30 <220>
 <221 > AMIDACIÓN
 <222> (16)...(16)
 <223> lisinamida
 <400> 29

Val Thr Ala Leu Trp Gly Lys Val Asn Val Asp Glu Val Gly Gly Lys
1 5 10 15

35 <210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> péptido H10 de la variante sintética HbE de hemoglobina

45 <220>
 <221 > MOD_RES
 <222> (2)...(2)
 <223> Xaa = ácido 6-amino hexanoico

50 <220>
 <221 > AMIDACIÓN
 <222> (10)...(10)
 <223> glicinamida

55 <400> 30

Cys Xaa Glu Val Gly Gly Lys Ala Leu Gly
1 5 10

60 <210> 31
 <211> 10

ES 2 665 958 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> péptido H10 bis de la variante sintética HbE de hemoglobina

10 <220>
 <221 > MOD_RES
 <222> (9)...(9)
 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

15 <220>
 <221 > AMIDACIÓN
 <222> (10)...(10)
 <223> cisteinamida

<400> 31

Glu Val Gly Gly Lys Ala Leu Gly Xaa Cys
 1 5 10

20 <210> 32
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> péptido H6 de la variante sintética HbD de hemoglobina

30 <220>
 <221 > MOD_RES
 <222> (1)...(1)
 <223> Val modificado por CYG

35 <220>
 <221 > AMIDACIÓN
 <222> (17)...(17)
 <223> alaninamida

40 <400> 32

Val Leu Ala His His Phe Gly Lys Gln Phe Thr Pro Pro Val Gln Ala
 1 5 10 15
 Ala

45 <210> 33
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> péptido H6 bis de la variante sintética HbD de hemoglobina

55 <220>
 <221 > MOD_RES
 <222> (17)...(17)
 <223> valinamida modificada por GYC

<400> 33

ES 2 665 958 T3

Gln Phe Thr Pro Pro Val Gln Ala Ala Tyr Gln Lys Val Val Ala Gly
 1 5 10 15
 Val

5 <210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> péptido H9 de la variante sintética HbD de hemoglobina

15 <220>
 <221 > MOD_RES
 <222> (15)...(15)
 <223> treoninamida modificada por GYC

<400> 34

Gly Lys Gln Phe Thr Gly Lys Gln Phe Thr Gly Lys Gln Phe Thr
 1 5 10 15

20 <210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> péptido H11 de la variante sintética HbD de hemoglobina

30 <220>
 <221 > MOD_RES
 <222> (2)...(2)
 <223> Xaa = ácido 6-amino hexanoico

35 <220>
 <221 > AMIDACIÓN
 <222> (10)...(10)
 <223> prolinamida

<400> 35

Cys Xaa His Phe Gly Lys Gln Phe Thr Pro
 1 5 10

40 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> péptido H11 bis de la variante sintética HbD de hemoglobina

55 <220>
 <221 > MOD_RES
 <222> (9)...(9)
 <223> Xaa = ácido 6-amino hexanoico

<220>
 <221 > AMIDACIÓN
 <222> (10)...(10)
 <223> cisteinamida

ES 2 665 958 T3

<400> 36

His Phe Gly Lys Gln Phe Thr Pro Xaa Cys
1 5 10

5 <210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido GP11 de la variante sintética HbA1-c de hemoglobina

<220>
<221 > MOD_RES
15 <222> (1)...(1)
<223> Val modificada por glucosa

<220>
<221 > MOD_RES
20 <222> (8)...(8)
<223> Xaa = ácido 6-amino hexanoico

<220>
<221 > AMIDACIÓN
25 <222> (9)...(9)
<223> cisteinamida

<400> 37

Val His Leu Thr Pro Glu Glu Xaa Cys
1 5

30 <210> 38
<211> 9
<212> PRT
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido GP3 de la variante sintética HbA1-c de hemoglobina

40 <220>
<221 > MOD_RES
<222> (1)...(1)
<223> Val modificada por un grupo 1-desoxi-fructopiranosil

45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (8)...(8)
<223> Xaa = ácido 6-amino hexanoico

50 <220>
<221 > AMIDACIÓN
<222> (9)...(9)
<223> cisteinamida

55 <400> 38

Val His Leu Thr Pro Glu Glu Xaa Cys
1 5

60 <210> 39

ES 2 665 958 T3

<210> 43
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> anticuerpo policlonal sintético pan-reactivo anti-epitopo de beta globina
10
<400> 43
Gly Asp Leu Ser Thr Pro
1 5

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
15
<220>
<223> anticuerpo policlonal sintético pan-reactivo anti-epitopo de beta globina
20
<400> 44
Leu Asp Asn Leu Lys Gly Thr Phe Ala Thr
1 5 10

<210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
25
<220>
<223> péptido RW1a de la variante sintética HbA1-c de la hemoglobina no glicada
30
<220>
<221> AMIDACIÓN
<222> (7)...(7)
<223> amida de ácido glutámico
35
<400> 45
Val His Leu Thr Pro Glu Glu
1 5

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
45
<220>
<223> anticuerpo monoclonal anti-epitopo mínimo de la variante sintética HbD de hemoglobina
50
<400> 46
Gly Lys Gln Phe Thr Pro Pro
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se une selectivamente a la variante de hemoglobina HbC y la HbC glicada, en el que el anticuerpo se une a un epítipo mínimo de HbC ⁴TPKEKSAVT¹².
- 5 2. Un anticuerpo monoclonal que se une selectivamente a la variante de hemoglobina HbS y la HbS glicada, en el que el anticuerpo se une a un epítipo mínimo de HbS ³LTPVEKSAVT¹².
3. Un anticuerpo monoclonal que se une selectivamente a la variante de hemoglobina HbE y la HbE glicada, en el que el anticuerpo se une a un epítipo mínimo de HbE ²²EVGGK²⁶ o ²¹DEVGGK²⁶.
4. Un anticuerpo monoclonal que se une selectivamente a la variante de hemoglobina HbD y la HbD glicada, en el que el anticuerpo se une a un epítipo mínimo de HbD ¹²¹QFTPP¹²⁵ o ¹¹⁹GKQFTPP¹²⁵.

10

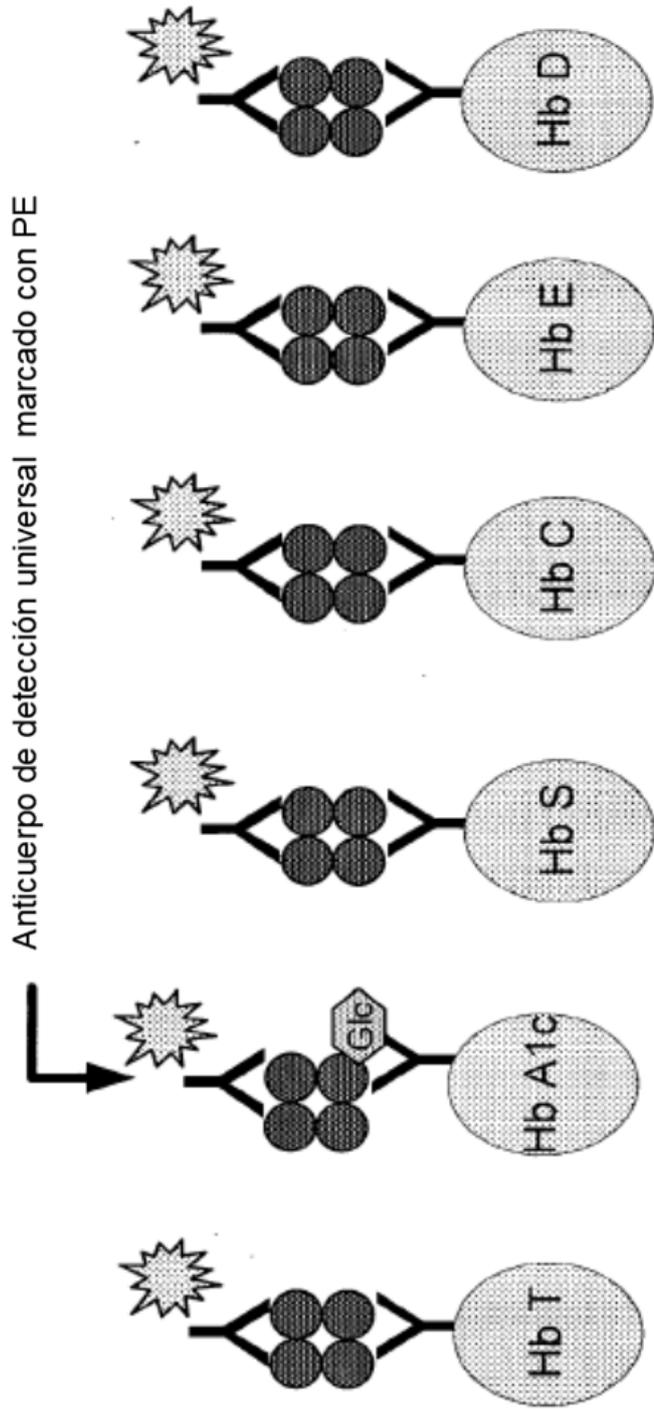


FIG. 1

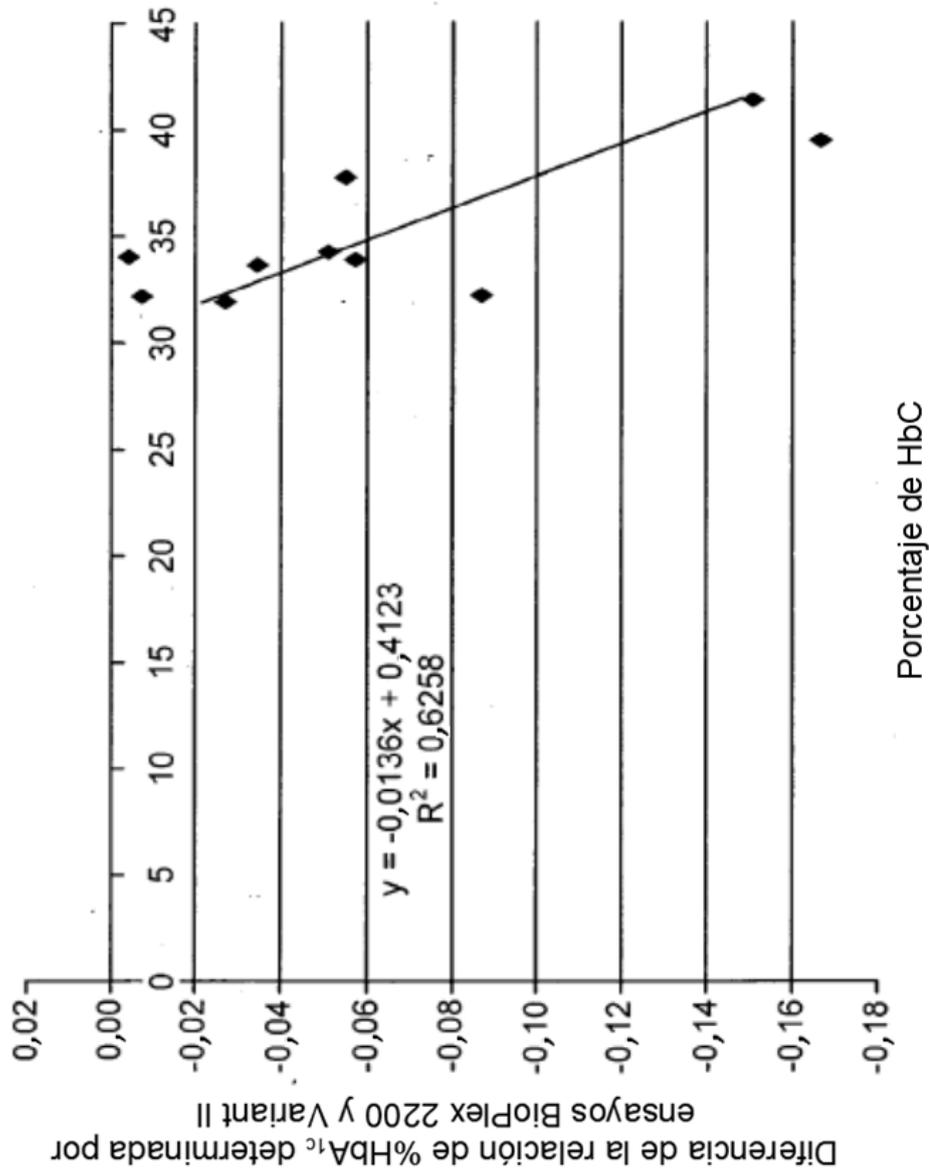


FIG. 2