

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 422**

51 Int. Cl.:

G01N 33/66 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2015** **E 15160916 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018** **EP 2924436**

54 Título: **Ensayo de glucosilación de proteínas salivales para diagnóstico y supervisión de diabetes**

30 Prioridad:

26.03.2014 US 201414226131

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

09.10.2018

73 Titular/es:

DIABETOMICS, INC. (100.0%)
2345 NW Amberbrook Drive, Suite 140
Hillsboro, OR 97006, US

72 Inventor/es:

NAGALLA, SRINIVASA y
BEAN, ERIC

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 685 422 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

Ensayo de glucosilación de proteínas salivales para diagnóstico y supervisión de diabetes

5 **Campo técnico**

Las realizaciones del presente documento se refieren al campo de la diabetes y más específicamente al diagnóstico y la supervisión de sujetos que tienen prediabetes, diabetes o complicaciones diabéticas.

10 **Antecedentes**

Los niveles de glucosa elevados vistos en prediabetes, diabetes gestacional y diabetes establecida pueden afectar a biomarcadores proteicos hallados en líquidos biológicos. Por ejemplo, el control glucémico puede afectar a la glucosilación no enzimática, directa, de proteínas en la que la glucosa se une covalentemente con proteínas diana mediante la formación de una base de Schiff entre el grupo aldehído de la molécula de glucosa y el grupo amino de un resto de lisina en una proteína. La base de Schiff experimenta después un reordenamiento de Amadori y oxidación para formar un producto final de glucosilación avanzado. Un ejemplo de un producto final de glucosilación avanzado es hemoglobina A1c (HbA1c). Los niveles en sangre de HbA1c representan el nivel de glucosa en sangre (GS) promedio durante los 3 meses anteriores, que refleja la vida útil de los glóbulos rojos que portan hemoglobina.

Hay varios problemas que surgen con el uso de HbA1c para supervisar la homeostasis de la glucosa, incluyendo su incapacidad para reflejar variaciones a más corto plazo en GS, efectos genéticos y no glucémicos significativos en los niveles de HbA1c, y variaciones significativas dependientes de la edad y étnicas en la relación entre los niveles de HbA1c y niveles de GS promedio. El uso de albúmina glucosilada o fructosamina como una alternativa ofrece la ventaja de reflejar un tiempo de respuesta más corto (por ejemplo, que representa el nivel de GS promedio durante las 2-4 semanas previas), pero los efectos de los diversos factores que dificultan la utilidad de HbA1c en la relación entre estas proteínas glucosiladas y niveles de GS previos siguen siendo problemáticos.

Belce A *et al*, Tohoku Journal of Experimental Medicine, Tohoku University Medical Press, Sendai, JP, Vol. 192, n.º 3, 1 de diciembre de 2000, páginas 219-225, se refiere a la evaluación del nivel de ácido siálico salival y actividad de Cu-Zn superóxido dismutasa en diabetes mellitus de tipo 1.

El documento WO 2010/132447 se refiere a un dispositivo de flujo lateral y kit para detectar glucoproteínas en una muestra de saliva.

35 **Breve descripción de los dibujos**

Las realizaciones de la presente divulgación se entenderán fácilmente por la siguiente descripción detallada junto con los dibujos adjuntos. Las realizaciones se ilustran como ejemplo y no como limitación en las figuras de los dibujos adjuntos.

Las **Figuras 1A y 1B** son gráficas que ilustran la relación de glucosilación salival basal con fructosamina (**Figura 1A**) y hemoglobina A1c (**Figura 1B**), de acuerdo con diversas realizaciones;

La **Figura 2** es una gráfica que ilustra glucosilación salival en sujetos a lo largo del tiempo, en la que se representa la glucosilación salival semanalmente frente al día de estudio para diez participantes, de acuerdo con diversas realizaciones;

Las **Figuras 3A, 3B, y 3C** son tres gráficas que ilustran la relación entre glucosilación salival y GS promedio, DT de GS y amplitud media de excursión de glucosa (MAGE) durante periodos de 21 días, en las que la glucosilación salival se representa frente a glucosa en sangre promedio durante 21 días (**Figura 3A**), desviación típica de glucosa en sangre (**Figura 3B**), y MAGE (**Figura 3C**) para los días de estudio 21 y 28, de acuerdo con diversas realizaciones;

Las **Figuras 4A, 4B, y 4C** ilustran una comparación de GS promedio durante 21 días con glucosilación salival, fructosamina y HbA1c, en las que la glucosa en sangre promedio durante 21 días se representa frente a la glucosilación salival (**Figura 4A**), fructosamina (**Figura 4B**), y hemoglobina A1c (**Figura 4C**) para el día 28 del estudio, de acuerdo con diversas realizaciones;

Las **Figuras 5A y 5B** ilustran una correlación de glucosa en sangre promedio durante 21 días y fructosamina por sujetos con variabilidad de glucosa en sangre baja y alta, en las que la glucosa en sangre promedio se correlaciona con la fructosamina (**Figura 5A**) y glucosilación salival (**Figura 5B**) para individuos con variabilidad de glucosa en sangre baja y alta, de acuerdo con diversas realizaciones;

Las **Figuras 6A y 6B** ilustran las dos reacciones químicas implicadas en los métodos de glucosilación salival descritos en el presente documento, la oxidación de peryodato de dioles adyacentes que genera aldehídos (**Figura 6A**), y la reactividad de 4-amino-3-hidracino-5-mercapto-1,2,4-triazol con aldehídos (AHMT) (**Figura 6B**), de acuerdo con diversas realizaciones;

Las **Figuras 7A y 7B** son dos gráficas que ilustran la precisión del ensayo de placa de glucosilación salival total, que comparan la curva patrón de fetuina bovina (**Figura 7A**) con la glucosilación salival total (**Figura 7B**), de acuerdo con diversas realizaciones;

Las **Figuras 8A y 8B** son una imagen digital (**Figura 8A**) y una gráfica (**Figura 8B**) que ilustran un ejemplo de un ensayo de fase sólida, de acuerdo con diversas realizaciones;

Las **Figuras 9A y 9B** son una imagen digital (**Figura 9A**) y una gráfica (**Figura 9B**) que ilustra el ciclo temporal de cambio de color para el ensayo de fase sólida, de acuerdo con diversas realizaciones;

Las **Figuras 10A, 10B, y 10C** ilustran una comparación de ensayos de placa y tira reactiva, incluyendo una gráfica que muestra una comparación del ensayo visual y la placa de ensayo (**Figura 10A**), una comparación del ensayo de tira reactiva y el ensayo de placa (**Figura 10B**), y una comparación del ensayo de tira reactiva, el ensayo de placa y muestras de CGMS (**Figura 10C**), de acuerdo con diversas realizaciones;

Las **Figuras 11A y 11B** ilustran una gráfica sumario del ensayo de tira reactiva (**Figura 11A**), y un diagrama esquemático de un ejemplo del ensayo de tira reactiva de dos membranas (**Figura 11B**), de acuerdo con diversas realizaciones;

Las **Figuras 12A y 12B** ilustran un diagrama esquemático de un ejemplo de un ensayo de flujo lateral de tres membranas, de una etapa, (**Figura 12A**) y una escala colorimétrica para interpretar resultados de ensayo (**Figura 12B**), de acuerdo con diversas realizaciones; y

Las **Figuras 13A y 13B** ilustran una tabla que muestra una comparación de tres ejemplos de una tira de ensayo de saliva de tres membranas (una etapa) que tiene concentraciones de peryodato sódico de 30, 50 y 100 mg/10 ml de tampón, y su eficacia (medida en porcentaje de reflectancia) en la detección de fetuina (**Figura 13A**), y una imagen digital de dos ejemplos de una tira de ensayo de saliva de tres membranas que muestra controles negativos y positivos, de acuerdo con diversas realizaciones.

Descripción detallada

En la siguiente descripción detallada, se hace referencia a los dibujos adjuntos que forman una parte de la presente, y en los que se muestran como ilustración realizaciones en las que puede practicarse la divulgación. Por lo tanto, la siguiente descripción detallada no debe interpretarse en un sentido limitante, y el alcance de realizaciones de acuerdo con la presente divulgación se define por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

Pueden describirse diversas operaciones como múltiples operaciones discretas a su vez, de una manera que puede ser útil para entender realizaciones de la presente divulgación; sin embargo, no debería interpretarse que el orden de descripción implique que estas operaciones dependen del orden.

La descripción puede usar descripciones basadas en la perspectiva tales como arriba/abajo, detrás/delante y superior/inferior. Dichas descripciones se usan únicamente para facilitar el análisis y no se pretende que restrinjan la aplicación de realizaciones de la presente divulgación.

Para los fines de la presente divulgación, la expresión "A/B" significa A o B. Para los fines de la presente divulgación, la expresión "A y/o B" significa "(A), (B) o (A y B)". Para los fines de la presente divulgación, la expresión "al menos uno de A, B y C" significa "(A), (B), (C), (A y B), (A y C), (B y C) o (A, B y C)". Para los fines de la presente divulgación, la expresión "(A)B" significa "(B) o (AB)" es decir, A es un elemento opcional.

La descripción puede usar las expresiones "en una realización", o "en realizaciones", que pueden cada uno referirse a una o más de las mismas o diferentes realizaciones. Asimismo, las expresiones "que comprende", "que incluye", "que tiene", y similares, como se usan con respecto a realizaciones de la presente invención, son sinónimas.

Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la presente divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de expresiones específicas:

Como se usa en el presente documento, el término "analito" se refiere a un átomo, molécula, grupo de moléculas o compuesto de origen natural o sintético (por ejemplo, aldehídos, glucolípidos o glucoproteínas) que se pretende detectar o medir. Los analitos pueden incluir, pero sin limitación, aldehídos, anticuerpos, fármacos, hormonas, antígenos, haptenos, glucoproteínas, glucolípidos, hidratos de carbono, apoproteínas y cofactores.

En general, las muestras biológicas pueden incluir todas las muestras clínicas útiles para la detección de perfil de glucosilación, cantidad de proteína o patrón de glucosilación de proteínas en sujetos, incluyendo, pero sin limitación, células, tejidos y líquidos corporales, tales como: sangre; derivados y fracciones de sangre, tales como suero; vesículas biliares extraídas; tejido biopsiado o retirado quirúrgicamente, incluyendo tejidos que están, por ejemplo, no fijados, congelados, fijados en formalina y/o incluidas en parafina; lágrimas; moco; saliva; leche; raspados cutáneos; lavados superficiales; orina; esputo; sudor; semen; secreción vaginal; líquido de úlceras y/u otras erupciones de superficie, ampollas, abscesos y/o extractos de tejidos; células u órganos; líquido cefalorraquídeo; líquido prostático; pus; o aspirados de médula ósea. Las muestras biológicas también pueden ser una muestra de investigación de laboratorio tal como un sobrenadante de cultivo celular. En particular las muestras usadas en los presentes métodos son muestras de saliva. La muestra puede recogerse u obtenerse usando métodos bien conocidos por los expertos en la materia.

Como se usa en el presente documento, la expresión "oxidar químicamente" se refiere a un proceso que implica poner en contacto de forma deliberada una muestra biológica, tal como una muestra de saliva, con un reactivo

oxidante químico. Como se usa en el presente documento, la expresión "químicamente oxidante" excluye procesos oxidantes de origen natural, tales como los que se producen cuando se exponen muestras biológicas a oxígeno, tal como el que puede estar presente en el aire ambiental. Más bien, la expresión abarca procesos oxidantes químicos resultantes de contacto deliberado con un agente oxidante sólido o líquido. En general, dicha oxidación química da como resultado todo o la mayoría del ácido siálico y/o fucosa en la muestra que se oxida, tal como al menos 50 %, al menos 70 %, al menos 90 %, o incluso más del ácido siálico y/o fucosa presente en la muestra que se oxida.

Como se usa en el presente documento, la expresión "que detecta" se refiere a determinar de forma cuantitativa o cualitativa la presencia del analito o los analitos que se investigan, tales como una glucoproteína o un aldehído.

Como se usa en el presente documento, la expresión "diabetes mellitus" se refiere a una enfermedad provocada por una falta relativa o absoluta de insulina que conduce a metabolismo de hidratos de carbono descontrolado, habitualmente simplificado a "diabetes", aunque la diabetes mellitus no debería confundirse con diabetes insípida. Como se usa en el presente documento, "diabetes" se refiere a diabetes mellitus, a menos que se indique otra cosa. Una "afección diabética" incluye prediabetes y diabetes. La diabetes de tipo 1 (en ocasiones denominada "diabetes insulino dependiente" o "diabetes de aparición juvenil") es una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por destrucción de células β pancreáticas que conduce a una falta total o casi total de insulina. En diabetes de tipo 2 (T2DM; denominada en ocasiones "diabetes no insulino dependiente" o "diabetes de aparición en adultos"), el cuerpo no responde a la insulina, aunque está presente. Como se usa en el presente documento, la expresión "afección metabólica" se usa para hacer referencia a diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, prediabetes y complicaciones de diabetes.

Los síntomas de diabetes incluyen: sed excesiva (polidipsia); micción frecuente (poliuria); hambre extrema o alimentación constante (polifagia); pérdida de peso inexplicada; presencia de glucosa en la orina (glucosuria); cansancio o fatiga; cambios en la visión; entumecimiento o cosquilleo en las extremidades (manos, pies); heridas o úlceras de curación lenta; y frecuencia de infección anormalmente alta. La diabetes puede diagnosticarse clínicamente por una concentración de glucosa en plasma en ayunas (GPA) de más de o igual a 7,0 mmol/l (126 mg/dl) o una concentración de glucosa en plasma de más de o igual a 11,1 mmol/l (200 mg/dl) a aproximadamente dos horas después de un ensayo de tolerancia a la glucosa oral (ETGO) con una carga de 75 g. Puede encontrarse una descripción más detallada de diabetes en Cecil Textbook of Medicine, J.B. Wyngaarden, *et al.*, eds. (W.B. Saunders Co., Filadelfia, 1992, 19ª ed.).

Como se usa en el presente documento, el término "glucosilación" se refiere a modificación covalente de una biomolécula (tal como una proteína o lípido) con una o más cadenas de oligosacáridos. Las proteínas que tienen al menos una modificación de oligosacárido se denominan "glucoproteínas" o "proteínas glucosiladas". En el caso de proteínas, la glucosilación es habitualmente ligada a N o ligada a O. La glucosilación ligada a N se refiere a enlace de un oligosacárido con el grupo amino de cadena lateral de un resto de asparagina en una proteína.

La glucosilación ligada a O se refiere a un enlace de un oligosacárido con la cadena lateral de hidroxilo de un aminoácido serina, treonina o hidroxilisina en una proteína.

Las cadenas de oligosacáridos de glucoproteínas tienen una enorme variedad, debido a la combinación de diversos azúcares (por ejemplo, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, N-acetilactosamina, manosa, galactosa, glucosa, ácido N-acetilneuramínico o fucosa) y la presencia de estructuras ramificadas (tales como estructuras biantenarias, triantenarias o tetraantenarias).

Como se usa en el presente documento, la expresión "dispositivo de flujo lateral" se refiere a un dispositivo que absorbe o adsorbe una muestra líquida, dirige esa muestra líquida a una zona de detección y usa un método de detección para generar una señal detectable en respuesta a la presencia o ausencia de un analito específico (tal como una glucoproteína, glucolípido o aldehído). El dispositivo puede ser una tira de ensayo usada en cromatografía de flujo lateral, en la que un líquido de muestra de ensayo, que se sospecha que contiene un analito, fluye (por ejemplo por acción capilar) a través de la tira (que está hecha frecuentemente de materiales absorbentes tales como papel, nitrocelulosa y celulosa). El líquido de ensayo y cualquier analito suspendido puede fluir a lo largo de la tira a una zona de detección en la que el analito (si está presente) interacciona con un agente de detección para indicar una presencia, ausencia y/o cantidad del analito. Un dispositivo de flujo lateral puede producir un resultado de ensayo que es cualitativo o cuantitativo.

Se han desvelado numerosos dispositivos analíticos de flujo lateral, e incluyen los mostrados en las patentes de Estados Unidos N.º 4.313.734; 4.435.504; 4.775.636; 4.703.017; 4.740.468; 4.806.311; 4.806.312; 4.861.711; 4.855.240; 4.857.453; 4.943.522; 4.945.042; 4.496.654; 5.001.049; 5.075.078; 5.126.241; 5.451.504; 5.424.193; 5.712.172; 6.258.548; 6.555.390; 6.699.722; y 6.368.876; documento EP 0810436; y documentos WO 92/12428; WO 94/01775; WO 95/16207; y WO 97/06439.

Muchos dispositivos de flujo lateral son ensayos de flujo lateral de una etapa en los que se pone un líquido biológico en un área de muestra en una tira absorbente (aunque pueden usarse materiales no absorbentes, y hacerse absorbentes aplicando un tensioactivo al material) y se permite que migre a lo largo de la tira hasta que el líquido

entra en contacto con un reactivo químico o compañero de unión específico que interacciona con un analito (tal como un aldehído, glucoproteína o glucolípido) en el líquido. Una vez que el analito interacciona con el reactivo químico o compañero de unión específico, una señal (tal como un colorante fluorescente o de otro modo visible) indica que se ha producido la interacción. Pueden colocarse múltiples reactivos químicos definidos o compañeros de unión específicos en la tira (por ejemplo en líneas paralelas) para detectar múltiples analitos en el líquido. Las tiras de ensayo también pueden incorporar indicadores de control, que proporcionan una señal de que el ensayo se ha realizado de forma adecuada, incluso si no se ve una señal positiva que indica la presencia (o ausencia) de un analito en la tira.

Como se usa en el presente documento, dos componentes sólidos están en "contacto operativo" o "contacto contiguo" cuando están en contacto, directa o indirectamente, de tal manera que un líquido acuoso pueda fluir de uno de los dos componentes al otro de forma sustancialmente ininterrumpida, por capilaridad o de otro modo. El contacto directo o contiguo significa que los dos elementos están en contacto físico, tal como borde con borde o parte anterior con posterior. Cuando dos componentes están en contacto directo, pueden solaparse con un solapamiento de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 3 mm. Sin embargo, los componentes pueden colocarse con bordes adyacentes. El "contacto indirecto" significa que los dos elementos no están en contacto físico, sino que se conectan por uno o más conductores. El contacto operativo también puede denominarse contacto "transmisor de líquidos" o "continuo fluido".

Como se usa en el presente documento, la expresión "área de aplicación de muestras" se refiere a un área en la que se introduce una muestra líquida en una tira de ensayo cromatográfica, tal como una tira de ensayo cromatográfica presente en un dispositivo de flujo lateral. En un ejemplo, la muestra puede introducirse en el área de aplicación de muestras por aplicación externa, como con un cuentagotas u otro aplicador. En otro ejemplo, la misma área de aplicación de muestras puede sumergirse directamente en la muestra, tal como cuando se hunde una tira de ensayo en un recipiente que contiene una muestra. En otro ejemplo más, la muestra puede verterse o expresarse en el área de aplicación de muestras.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "soporte sólido" y "sustrato" se refieren a cualquier material que sea insoluble o pueda hacerse insoluble mediante una reacción posterior. Los expertos en la materia conocen numerosos y variados soportes sólidos y estos incluyen, sin limitación, nitrocelulosa, las paredes de pocillos de una bandeja de reacción, placas multipocillo, tubos de ensayo, perlas de poliestireno, perlas magnéticas, membranas y micropartículas (tales como partículas de látex). Esta expresión contempla cualquier material poroso adecuado con suficiente porosidad para permitir el acceso por reactivos detectores y una afinidad de superficie adecuada para inmovilizar reactivos de captura (por ejemplo, anticuerpos). Por ejemplo, la estructura porosa de nitrocelulosa tiene excelentes calidades de absorción y adsorción para una amplia diversidad de reactivos, por ejemplo, reactivos de captura. El nailon posee características similares y también es adecuado. Las estructuras microporosas son útiles, como los son materiales con estructura de gel en el estado hidratado.

Los ejemplos adicionales de soportes sólidos útiles incluyen: hidratos de carbono poliméricos naturales y sus derivados sintéticamente modificados, reticulados o sustituidos, tales como agar, agarosa, ácido algínico reticulado, gomas guar sustituidas y reticuladas, ésteres de celulosa, especialmente con ácido nítrico y ácidos carboxílicos, ésteres de celulosa mixtos y éteres de celulosa; polímeros naturales que contienen nitrógeno, tales como proteínas y derivados, incluyendo gelatinas reticuladas o modificadas; polímeros de hidrocarburos naturales, tales como látex y goma; polímeros sintéticos que pueden prepararse con estructuras convenientemente porosas, tales como polímeros de vinilo, incluyendo polietileno, polipropileno, poliestireno, policloruro de vinilo, polivinilacetato y sus derivados parcialmente hidrolizados, poli(acrilamidas, polimetacrilatos, copolímeros y terpolímeros de los policondensados anteriores, tales como poliésteres, poliamidas y otros polímeros, tales como poliuretanos o poliepoóxidos; materiales inorgánicos porosos tales como sulfatos o carbonatos de metales alcalinotérreos y magnesio, incluyendo sulfato de bario, sulfato de calcio, carbonato de calcio, silicatos de metales alcalinos y alcalinotérreos, aluminio y magnesio; y óxidos o hidratos de aluminio o silicio, tales como arcillas, alúmina, talco, caolín, ceolita, gel de sílice, vidrio o fibras de vidrio (en algunos ejemplos, estos materiales pueden usarse como filtros con los materiales poliméricos anteriores); y mezclas o copolímeros de las clases anteriores, tales como copolímeros de injerto obtenidos inicializando la polimerización de polímeros sintéticos en un polímero natural preexistente.

La superficie de un soporte sólido puede activarse mediante procesos químicos que provocan enlace covalente de un agente (por ejemplo, un reactivo químico) con el soporte. Sin embargo, puede usarse cualquier otro método adecuado para inmovilizar un agente (por ejemplo, un reactivo químico) en un soporte sólido incluyendo, sin limitación, interacciones iónicas, interacciones hidrófobas, interacciones covalentes y similares. Una fase sólida puede elegirse por su capacidad intrínseca para atraer e inmovilizar un agente, tal como un reactivo químico. El factor puede incluir una sustancia con carga que tiene carga opuesta con respecto a, por ejemplo, el reactivo químico. Excepto cuando esté físicamente restringido de otro modo, puede usarse un soporte sólido en cualquier forma adecuada, tal como películas, láminas, tiras o placas, o puede aplicarse sobre, o unirse o laminarse con vehículos inertes apropiados, tales como papel, vidrio, películas de plástico o telas. Como se usa en el presente documento un "sustrato de flujo lateral" es cualquier soporte sólido o sustrato que sea útil en un dispositivo de flujo lateral.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un organismo vertebrado multicelular vivo, una categoría que incluye seres humanos y mamíferos no humanos (tales como sujetos de laboratorio o veterinarios).

5 Las realizaciones del presente documento proporcionan métodos y ensayos para diagnosticar y/o supervisar una afección metabólica tal como diabetes en un sujeto, en los que los métodos y ensayos miden glucoproteínas salivales. En diversas realizaciones, los métodos se basan en la oxidación de glucoproteínas en una muestra del sujeto, tal como saliva u orina, por ejemplo usando metaperyodato sódico, y después detección de los aldehídos generados durante la oxidación usando un método de detección química. En diversas realizaciones, el método se
10 basa en el hallazgo de que las glucoproteínas específicas oxidadas en la muestra, principalmente ácido siálico y fucosa, proporcionan una medida precisa del control glucémico en comparación con herramientas de supervisión tradicionales tales como HbA1c y fructosamina.

15 Este hallazgo es inesperado porque estudios previos con unión a lectina han demostrado que era necesario un panel de lectinas de cinco miembros (por ejemplo, lectina de *Aleuria aurantia*, Concanavalina A, aglutinina de *Phaseolus vulgaris*, lectina de *Datura stramonium* y lectina de *Sambucus nigra*) para la predicción más precisa del estado glucémico. Estas lectinas se unen con ácido siálico y fucosa, pero también manosa, galactosa y N-acetilglucosamina. Por el contrario, los métodos desvelados en el presente documento solamente requieren la detección de los productos de oxidación de ácido siálico y fucosa. Una ventaja adicional del método es que como un
20 método de detección puramente químico, no se basa en que lectinas o anticuerpos se unan con restos de hidratos de carbono presentes en glucoproteínas.

Los ensayos de HbA1c y fructosamina miden la glucosilación de proteínas directa, no enzimática. Los métodos desvelados por la presente miden en su lugar proteínas que son modificadas por glucosilación intracelular a diferencia de glucación no enzimática, evitando de este modo los problemas asociados con ensayos basados en glucación. La hiperglucemia aumenta el flujo de glucosa a través de la ruta biosintética de hexosamina, que proporciona los precursores de UDP-GlcNAc y GalNAc para la adición de diversos restos de hidratos de carbono a proteínas O-glucosilación ligada a β de proteínas intracelulares así como O-glucosilación de tipo mucina ligada a α y N-glucosilación ligada a β de proteínas de superficie celular y secretadas. La O-glucosilación de proteínas intracelulares modula la capacidad de diversas células para responder a insulina y, sin quedar ligado a teoría alguna, los niveles de proteínas O y N-glucosiladas de tipo mucina secretadas pueden reflejar metabolismo celular alterado debido a hiperglucemia. Adicionalmente, sin quedar ligado a teoría alguna, la hiperlipidemia puede regular la actividad de ruta biosintética de hexosamina. Por lo tanto, la determinación de los niveles de glucoproteínas en líquido biológico representa una respuesta más rápida, sensible e inherentemente fisiológica al control metabólico en comparación con biomarcadores proteicos glucados convencionales.
35

Aunque prácticamente todas las evaluaciones del estado glucémico emplean en la actualidad muestras de sangre, hay muchos casos en los que esto no es ideal, debido a la edad del paciente o su actitud frente a las punciones digitales o la venopunción, o problemas de higiene en áreas rurales o poco desarrolladas. Por el contrario, la saliva tiene varias ventajas claras como un líquido de diagnóstico, incluyendo que no es invasivo y que puede obtenerse sin entrenamiento o equipamiento especial, y puede ser especialmente ventajoso para poblaciones pediátricas o ancianas y susceptible de estudios en población a gran escala. Por lo tanto, los métodos desvelados en el presente documento emplean análisis de glucoproteínas salivales (y en algunos casos urinarias) para evaluación a corto plazo del control glucémico.
40

45 También se desvelan en diversas realizaciones ensayos de placa, ensayos de tira reactiva y dispositivos de flujo lateral para detectar glucoproteínas salivales. En algunas realizaciones, los ensayos pueden incluir un ensayo de tira reactiva de dos membranas para detectar y/o cuantificar proteínas glucosiladas en muestras de saliva preoxidadas. Otras realizaciones son dispositivos de flujo lateral de tres membranas para oxidar las glucoproteínas en una muestra salival y después detectar los aldehídos resultantes.
50

Ejemplos

Ejemplo 1: Población objeto

55 Se reclutaron un total de diez sujetos de un grupo de 70 enfermos de diabetes de tipo 2 a cargo del Nizam's Institute of Medical Sciences, Hyderabad, India. Las características clínicas de los sujetos se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Características clínicas de sujetos

Característica participante	Número (%)
Sexo masculino	9 (90)

60

Característica participante (unidades)	Media (DT)
Edad (años)	42,6 (16,9)
Índice de masa corporal (kg/m ²)	26,3 (4,3)
Tensión arterial sistólica (mmHg)	127 (15)
Colesterol total (mg/dl)	176 (42)
LDL (mg/dl)	114 (35)
HDL (mg/dl)	32 (7)
Triglicéridos (mg/dl)	148 (68)
Glucosa en plasma en ayunas (mg/dl)	162 (60)
Hemoglobina A1c (%)	9,3 (2,8)
Insulina en ayunas (mUI/l)	40,5 (43,4)
Péptido C (ng/ml)	1,46 (0,97)

Los sujetos se sometieron a supervisión de glucosa continua (SGC) usando monitores Guardian REAL-Time (Medtronic, Inc., Northridge, CA) durante 28 días continuos con visitas de estudio semanales para calibración del dispositivo y recogida de muestras. El ciclo de tratamiento de los sujetos para diabetes no se alteró basándose en los resultados de la SGC. El número promedio de medidas de GS obtenidas durante el seguimiento del estudio fue de 6909 ± 436 (media ± DT) por sujeto. Se pidió a los sujetos que no comieran ni fumaran durante al menos 8 horas antes de las visitas de estudio que se realizaban entre las 8:00 y las 9:00 los días 1, 7, 14, 21 y 28 después de la visita basal. Se recogieron muestras de saliva no estimuladas en cada visita de estudio y se realizaron extracciones de sangre convencionales en la línea basal y el día 28. Además, se obtuvieron parámetros clínicos, incluyendo altura, peso y tensión arterial, en la línea basal y en la visita de estudio final.

Ejemplo 2: Ensayos de saliva y sangre

Se diluyeron muestras de saliva 1:5 en ácido acético 2 %, pH 4,5. Se añadieron alícuotas de 50 µl por duplicado de muestra diluida por pocillo de una placa de poliestireno Reacti-Bind de 96 pocillos (Thermo Scientific, Rockford, IL) seguido de 25 µl de metaperyodato sódico 10 mM (preparado inmediatamente antes de su uso en ácido acético 2 %, pH 4,5). La placa se agitó en un agitador rotatorio durante 30 segundos y después se cubrió y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al final de la incubación, se añadieron 150 µl de solución de AHMT (175 mg de 4-Amino-3-hidracino-5-mercapto-1,2,4-triazol en 35 ml de NaOH 1N; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La placa se agitó en un agitador rotatorio durante 30 segundos, después se cubrió y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Se determinó la absorbancia a 550 nm usando un lector de placas ELx800 (BioTek, Winooski, VT). Los resultados se normalizaron por concentración de proteína total y se presentaron en unidades arbitrarias (UA). Las muestras de sangre se procesaron usando un analizador químico AU400e (Olympus, Center Valley, PA) para cuantificación de fructosamina y un cromatógrafo líquido de alto rendimiento HLC-723 G8 (Tosoh Bioscience, King of Prussia, PA) para mediciones de HbA1c.

Ejemplo 3: Análisis estadístico

Se tabularon las características basales de la población objeto así como el cambio durante 28 días en parámetros clínicos relevantes. Un sujeto carecía de datos de SGC para los días 20-28 y se excluyó de todos los análisis de SGC para esos días. Para cuantificar el control glucémico a partir de los datos de SGC, se calcularon GS promedio, desviación típica (DT) de GS y amplitud media de la excursión glucémica (MAGE; 30) y se emparejaron con visitas de estudio de los días 7, 14, 21 y 28. Debido al pequeño tamaño de la muestra, los análisis fueron principalmente descriptivos e incluyeron representaciones de medidas de glucosilación a lo largo del tiempo con HbA1c, fructosamina, GS promedio, DT de GS y MAGE promedio. Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson y se representaron para todas las medidas en línea basal y los días 1, 7, 14, 21 y 28. Se realizó un análisis de medidas repetidas, longitudinal exploratorio, para evaluar la capacidad de la glucosilación salival medida para predecir la GS promedio, DT de GS y MAGE a intervalos de 7, 14, 21 y 28 días y para determinar el intervalo para el que la glucosilación salival es más predictiva. Se realizó un análisis secundario sobre el efecto de la variabilidad de glucosa en sangre en la relación entre GS promedio con fructosamina y glucosilación salival creando grupos de variabilidad de GS alta y baja (según DT de GS) y correlacionando la GS promedio con fructosamina y glucosilación salival por separado para cada grupo de variabilidad. Para maximizar la diferencia en la variabilidad entre los grupos, los grupos de variabilidad de GS alta y baja incluyeron cuatro sujetos con la mayor y menor variabilidad, respectivamente. Los valores de p indicados tienen dos aspectos. Se realizó análisis estadístico usando software SAS, Versión 9.3 del sistema SAS para Windows.

Ejemplo 4: Los cambios de glucosilación salival reflejan diferentes niveles de glucemia

Se realizó un análisis de glucosilación salival usando los métodos descritos anteriormente en los Ejemplos 1-4 en una serie de 10 sujetos con diabetes de tipo 2 que se habían sometido a 28 días de SGC para determinar si los niveles de glucoproteínas salivales se correlacionaban con glucemia relativa. Como se muestra en las **Figuras 1A y 1B**, las medidas de glucosilación salival basales se correlacionaron fuertemente con valores de fructosamina basales (**Figura 1A**; $r=0,65$, $p=0,06$) y se correlacionaron moderadamente con HbA1c (**Figura 1B**; $r=0,30$, $p=0,40$). La glucosilación salival se correlacionó fuertemente con fructosamina y se correlacionó moderadamente con hemoglobina A1c.

Se representaron los valores longitudinales de glucosilación salival a lo largo del tiempo para analizar el intervalo y variabilidad de estos sujetos (**Figura 2**). Se calcularon la media de glucosilación salival, DT e intervalo para cada sujeto y se muestran a continuación en la **Tabla 2**. Para medir la relación entre la variabilidad en la glucosilación salival y variabilidad en GS, la DT glucosilación salival se correlacionó con DT de GS sobre todos los datos disponibles y se encontró una fuerte correlación entre las dos medidas ($r=0,56$, $p=0,12$).

Tabla 2. Estadística descriptiva de glucosilación salival por sujeto

Sujeto	Glucosilación salival media (UA)	Desviación típica	Intervalo
1	1,51	0,92	0,10 - 2,38
2	1,96	0,60	1,34 - 2,92
3	0,37	0,05	0,28 - 0,41
4	3,04	0,82	1,65 - 3,74
5*	0,56	0,42	0,18 - 1,26
6	1,20	0,67	0,38 - 2,05
7	0,99	0,70	0,24 - 1,98
8	1,10	1,04	0,43 - 2,95
9	0,77	0,32	0,48 - 1,31
10	0,27	0,12	0,16 - 0,49

*El sujeto 5 carecía de datos de glucosilación salival del día 21

Los coeficientes de correlación de Pearson y valores de p correspondientes para correlación de mediciones de glucosilación salival con GS promedio, DT de GS y MAGE a lo largo de 7, 14, 21 y 28 días indicaron que la relación más fuerte estaba entre glucosilación salival y GS promedio durante 21 días ($r=0,56$, $p=0,23$ el día 21 y $r=0,42$, $p=0,26$ el día 28). Se presentan los resultados de este análisis en las **Figuras 3A, 3B, y 3C**, que ilustran la relación entre glucosilación salival y GS promedio, DT de GS y amplitud media de excursión de glucosa (MAGE) durante periodos de 21 días, en las que la glucosilación salival se representa frente a glucosa en sangre promedio durante 21 días (**Figura 3A**), desviación típica de glucosa en sangre (**Figura 3B**), y MAGE (**Figura 3C**) para los días 21 y 28, de acuerdo con diversas realizaciones. Los resultados de un análisis de medidas repetidas, longitudinal exploratorio, confirmaron este hallazgo, teniendo la glucosilación salival una relación longitudinal significativa con GS promedio durante 21 días ($p<0,01$). La glucosilación salival se correlacionó fuertemente con la glucosa en sangre promedio para los días de estudio tanto 21 como 28, pero se correlacionó débilmente tanto con la desviación típica de glucosa en sangre como con MAGE, excepto el día 28 cuando se correlacionó fuertemente con la desviación típica de glucosa en sangre.

Las medidas de SGC del control glucémico se correlacionaron con medidas de glucosilación salival, fructosamina y HbA1c. Las **Figuras 4A, 4B, y 4C** ilustran una comparación de GS promedio durante 21 días con glucosilación salival, fructosamina y HbA1c, en las que la glucosa en sangre promedio durante 21 días se representa frente a la glucosilación salival (**Figura 4A**), fructosamina (**Figura 4B**), y hemoglobina A1c (**Figura 4C**) para el día 28 del estudio, de acuerdo con diversas realizaciones. Como se muestra en las **Figuras 4A, 4B, y 4C**, las medidas de glucosilación salival demostraron correlación más fuerte con GS promedio durante 21 días que HbA1c o fructosamina. Hubo una fuerte relación positiva entre la glucosilación salival y la glucosa en sangre promedio. La glucosa en sangre promedio se correlacionó poco con fructosamina y hemoglobina A1c. La **Tabla 3** proporciona los coeficientes de correlación de Pearson para GS promedio, DT de GS y MAGE durante 21 días con glucosilación salival del día 28, fructosamina y HbA1c. La glucosilación salival fue el predictor más potente de GS promedio y DT de GS en comparación con fructosamina y HbA1c, mientras que la fructosamina fue el predictor más potente de MAGE.

Tabla 3. Correlación del día 28 de glucosa en sangre promedio de 21 días con glucosilación salival, fructosamina y HbA1c.

Medida de glucemia (unidades)	GS promedio		DT de GS		MAGE	
	Coefficiente de correlación de Pearson	valor de p	Coefficiente de correlación de Pearson	valor de p	Coefficiente de correlación de Pearson	valor de p
Glucosilación salival (UA)	0,42	0,26	0,56	0,12	0,44	0,23
Fructosamina (mmol/l)	-0,15	0,72	0,43	0,29	0,73	0,04*
Hemoglobina A1c (%)	-0,10	0,80	0,33	0,39	0,57	0,11

*p<0,05

- 5 Se realizó un subanálisis para determinar si la relación de glucosilación salival y fructosamina con GS promedio estaba mediada por la variabilidad de GS. Los sujetos en el grupo de baja variabilidad tuvieron una DT de GS promedio de 31 mg/dl, mientras que los sujetos en el grupo de alta variabilidad tuvieron una DT de GS de 65 mg/dl. Para sujetos en el grupo de baja variabilidad, la fructosamina fue un predictor potente ($r=0,98$) de glucosa en sangre promedio; sin embargo, para el grupo de alta variabilidad, los aumentos de fructosamina predijeron potentemente reducciones de GS promedio, directamente opuesto a lo que se esperaría clínicamente. La glucosilación salival fue un predictor potente de GS promedio el grupo de variabilidad tanto baja como alta ($r=0,82$, $r=0,64$) y esto no se vio afectado en gran medida por la variabilidad de GS. Las **Figuras 5A** y **5B** ilustran estas relaciones. Más específicamente, las **Figuras 5A** y **5B** ilustran una correlación de glucosa en sangre promedio durante 21 días y fructosamina por sujetos con variabilidad de glucosa en sangre baja y alta, en las que la glucosa en sangre promedio se correlaciona con la fructosamina (**Figura 5A**) y glucosilación salival (**Figura 5B**) para individuos con variabilidad de glucosa en sangre baja y alta, de acuerdo con diversas realizaciones. La variabilidad de glucosa en sangre aumentada debilitó la relación de glucosa en sangre promedio con fructosamina, pero no con glucosilación salival, de acuerdo con diversas realizaciones.
- 10
- 15
- 20 En los métodos descritos anteriormente, el ácido siálico y la fucosa se oxidan fácilmente para generar aldehídos, y las **Figuras 6A** y **6B** ilustran las dos reacciones químicas implicadas en los métodos de glucosilación salival descritos en el presente documento: la oxidación de peryodato de dioles adyacentes que genera aldehídos (**Figura 6A**), y la reactividad de 4-amino-3-hidracino-5-mercapto-1,2,4-triazol con aldehídos (AHMT) (**Figura 6B**), reacción que genera un cambio de color, por ejemplo que puede detectarse visualmente o con un colorímetro.
- 25

Ejemplo 5: Ensayo de glucosilación de proteínas salivales para diagnóstico y supervisión de diabetes

La serie de enfoques para determinar el control glucémico varía de parámetros exclusivamente basados en glucosa tales como ensayos de GS aleatorios empleados de forma rutinaria por individuos con diabetes de tipo 1 y GS en ayunas y ensayos de tolerancia a la glucosa oral para evaluar la glucosa en ayunas alterada o tolerancia a la glucosa alterada en prediabetes y diabetes de tipo 2, a índices glucación de proteínas inducida por hiperglucemia (HbA1c, fructosamina y albúmina glucada) y reabsorción de 1,5-anhidroglucitol. La variabilidad glucémica ha surgido como un aspecto potencialmente importante de la supervisión del control glucémico que puede estar más asociado con el desarrollo de complicaciones tales como enfermedad cardiovascular que los niveles de GS promedio. Aunque la utilidad clínica de la evaluación de la variabilidad glucémica en exploración o supervisión rutinaria sigue siendo polémica, el efecto de la variabilidad glucémica en la realización de ensayos para GS promedio es importante, como se analiza más adelante. Los ensayos existentes para glucemia promedio a largo y corto plazo tienen varias desventajas, notablemente la incapacidad de HbA1c para reflejar la variabilidad intrínseca en los niveles de glucosa en pacientes individuales y discrepancias en los niveles de glucosa promedio obtenidos de diferentes mediciones (la denominada distancia de glucación).

30

35

40

Se describe en el presente documento un parámetro alternativo de glucemia (glucosilación de proteína total) que está conducido por el metabolismo celular y que puede discernirse en la saliva. Específicamente, las medidas de glucosilación salivales basales están fuertemente correlacionadas con fructosamina ($r=0,65$), una medida de control glucémico de 2 a 4 semanas. Adicionalmente, en comparación con HbA1c y fructosamina, las medidas de glucosilación salival fueron mejores predictores de GS promedio y DT de GS durante un intervalo de 21 días. Asimismo, las medidas de glucosilación salival mostraron una correlación más fuerte con medidas de control glucémico que fructosamina o HbA1c y con respecto a predicción de la hiperglucemia, la precisión de fructosamina se vio afectada por la variabilidad de GS, mientras que la precisión de la glucosilación salival no.

45

50

Por lo tanto, la glucosilación salival es un biomarcador alternativo potente para hiperglucemia reciente, ya que tiene mejor capacidad para predecir medidas de glucosa en sangre de 21 días que HbA1c o fructosamina. Adicionalmente, la capacidad para usar saliva en lugar de sangre constituye una ventaja significativa, separada, para

la glucosilación salival. Un uso importante para un indicador no invasivo de glucemia a corto plazo sería permitir que los pacientes en terapia que supervisaran de forma más conveniente su control glucémico. Esto puede aumentar la tasa actualmente baja de adherencia a las medicaciones de diabetes, un aumento de la cual tendría el potencial de ahorrar costes sanitarios significativos.

5

Ejemplo 6: Ensayo de placa

Las **Figuras 7A** y **7B** son dos gráficas que ilustran la precisión del ensayo de placa de glucosilación salival total, que comparan la curva patrón de fetuina bovina (**Figura 7A**) con la glucosilación salival total (**Figura 7B**), de acuerdo con diversas realizaciones;

10

En un ejemplo específico, no limitante, el ensayo de placa se puede llevar a cabo de la siguiente manera:

1. Añadir 40 µl de HOAc 2 % pH 4,5 a pocillos de ensayo
2. Colocar patrones de 50 µl y muestras de 10 µl en los pocillos apropiados
3. Preparar inmediatamente antes de su uso y añadir 25 µl de solución de NaIO₄ (10 mM, o 21,4 mg/10 ml de tampón de ensayo)
4. Mezclar durante 30 segundos y cubrir e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente
5. Preparar inmediatamente antes de su uso y añadir 150 µl de solución de AHMT (34 mM, o 175 mg en 35 ml de NaOH 1 N)
6. Mezclar durante 30 segundos y después cubrir e incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente
7. Leer a A550 nm

15

20

Ejemplo 7: Creación de un ensayo de tira reactiva

25

Aunque los ensayos descritos anteriormente en los Ejemplos 1-6 producen resultados precisos que se correlacionan bien con una glucosa promedio de 21 días, en algunas realizaciones, un ensayo basado en tira reactiva puede ser más deseable para su uso en el lugar de asistencia que un ensayo basado en líquido llevado a cabo en una placa de microtitulación. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los métodos desvelados pueden llevarse a cabo usando un ensayo basado en tira reactiva. Sin embargo, en diversas realizaciones, la adaptación del ensayo de placa para usar en un formato de tira reactiva puede ser difícil. Por ejemplo, la inmovilización de AHMT requiere la selección del sustrato de membrana óptimo (en total, se evaluaron más de 50 membranas diferentes y solamente algunas resultaron ser adecuadas), la concentración de reactivo óptima y el tiempo de reacción óptimo, y puede ser difícil conseguir la estabilidad del resultado colorimétrico, también. En algunas realizaciones, la incorporación de peryodato y álcali a la membrana puede ser difícil, también.

30

35

Las **Figuras 8A** y **8B** son una imagen digital (**Figura 8A**) y una gráfica (**Figura 8B**) que ilustran un ejemplo de un ensayo prototípico de fase sólida, de acuerdo con diversas realizaciones. En el ejemplo ilustrado en la **Figura 8**, se creó un ensayo de fase sólida inmovilizando AHMT en una membrana (se saturó membrana de fibra de vidrio VWR 698 con una solución de 0,2 g de AHMT disuelto en 20 ml de DMSO, se transfirió, después se secó a 50 °C durante una hora). La muestra se oxidó y se añadieron 20 µl de muestra a cada membrana, seguido de 25 µl de NaOH 2 N. Las **Figuras 9A** y **9B** son una imagen digital (**Figura 9A**) y una gráfica (**Figura 9B**) que ilustra el ciclo temporal de cambio de color para el ensayo de fase sólida, de acuerdo con diversas realizaciones.

40

En algunas realizaciones, puede usarse un ensayo de tira reactiva de dos membranas en lugar del ensayo de fase sólida representado en las **Figuras 8** y **9**. En un ensayo de tira reactiva de dos membranas ejemplar, se usa un dispositivo de membrana que incluye una membrana de AHMT y una membrana de álcali. Sorprendentemente, las soluciones acuosas sencillas de NaOH no funcionan cuando se secan en una membrana. Sin embargo, cuando se usó un etanol acuoso al 80 % como el disolvente para NaOH, la membrana resultante mejoró en gran medida la velocidad de reacción. La etapa de oxidación se lleva a cabo durante treinta segundos antes de la aplicación de la muestra a las membranas de tira reactiva, la muestra se añade a la membrana y la tira reactiva se lee usando un colorímetro después de cinco minutos.

45

50

En algunas realizaciones, puede usarse un ensayo de tira reactiva de tres membranas en lugar del ensayo de fase sólida representado en las **Figuras 8** y **9**. En un ensayo de tira reactiva de tres membranas ejemplar, se usa un dispositivo de membrana que incluye una membrana de AHMT, una membrana de álcali y una membrana de metaperyodato de sodio. Las soluciones de metaperyodato de sodio en ácido acético no rindieron bien cuando se secaron en membranas y metaperyodato de sodio en tampón de MES, pH 5 (habitualmente usado para estudios de oxidación de glucoproteínas) produjo señal de fondo inaceptablemente alta en ausencia de glucoproteína. Sin embargo, el metaperyodato de sodio disuelto en fosfato de sodio 50 mM, pH 5,5 funciona bien y es estable cuando se seca en membrana de fibra de vidrio YWR 692. Las **Figuras 13A** y **13B** son una tabla y una imagen digital que demuestran la viabilidad de un ensayo de una etapa.

55

60

En contraste con el ensayo de placa líquido descrito anteriormente en el **Ejemplo 6**, que requiere realizar una solución nueva de AHMT en NaOH inmediatamente antes de su uso, el ensayo de tira reactiva de dos membranas evita este problema incluyendo dos membranas separadas por una capa de malla, una con AHMT inmovilizado y la

65

otra con NaOH. En diversas realizaciones, las dos membranas no pueden entrar en contacto íntimo entre sí o el AHMT estará inactivado. Por lo tanto, el separador de malla se usa para evitar el contacto íntimo entre las membranas.

- 5 Mientras que el ensayo líquido requiere 60 minutos de incubación con AHMT después de oxidación de peryodato, el ensayo de fase sólida solamente requiere 5-10 minutos. El aducto inicial de aldehído con AHMT es incoloro y solamente después de oxidación posterior por O₂ del aire se vuelve morado. Este proceso tiene difusión limitada y el área de superficie alta de las membranas en la que se inmoviliza el AHMT facilita esta parte de la reacción.
- 10 Adicionalmente, la selección de membranas es importante. En diversas realizaciones, las membranas deben elegirse para que no reaccionen con peryodato, AHMT o NaOH, y requieren suficiente porosidad para permitir el flujo de una membrana a la otra.

15 Las **Figuras 10A, 10B, y 10C** ilustran una comparación de ensayos de placa y tira reactiva, incluyendo una gráfica que muestra una comparación del ensayo de fase sólida y la placa de ensayo (**Figura 10A**), una comparación del ensayo de tira reactiva y el ensayo de placa (**Figura 10B**), y una comparación del ensayo de tira reactiva, el ensayo de placa y muestras de CGMS (**Figura 10C**). Las Figuras 11A y 11B ilustran una gráfica sumario del ensayo de tira reactiva (**Figura 11A**), y un diagrama esquemático de un ejemplo del ensayo de tira reactiva de dos membranas (**Figura 11B**), de acuerdo con diversas realizaciones. En la realización ilustrada en la **Figura 11B**, dos membranas separadas están en contacto operativo entre sí y separadas por una capa de malla, una con AHMT inmovilizado y la otra con NaOH. En diversas realizaciones, el separador de malla se usa para evitar el contacto íntimo entre las membranas, evitando de este modo la inactivación del AHMT.

25 Las **Figuras 12A y 12B** ilustran un diagrama esquemático de un ejemplo de un ensayo de flujo lateral de una etapa, (**Figura 12A**) y una escala colorimétrica para interpretar resultados de ensayo (**Figura 12B**), de acuerdo con diversas realizaciones. En la realización ilustrada, la muestra se aplica a un área de aplicación de muestras y fluye a (o se aplica directamente a) una membrana de NaIO₄ (por ejemplo, una primera membrana), en la que las proteínas glucosiladas en la muestra se oxidan químicamente. Los productos de oxidación (principalmente ácido siálico oxidado y fucosa) pasan después a una segunda membrana con NaOH inmovilizado, a través de un separador de malla y a una tercera membrana que tiene AHMT inmovilizado en la misma. En diversas realizaciones, el separador de malla se usa para permitir el contacto operativo entre las segunda y tercera membranas pero para evitar el contacto íntimo entre las mismas, evitando de este modo la inactivación del AHMT.

35 Las **Figuras 13A y 13B** ilustran una tabla que muestra una comparación de tres ejemplos de una tira de ensayo de saliva de tres membranas (una etapa) que tiene concentraciones de peryodato sódico de 30, 50 y 100 mg/10 ml de tampón, y su eficacia (medida en porcentaje de reflectancia) en la detección de fetuina (**Figura 13A**), y una imagen digital de dos ejemplos de una tira de ensayo de saliva de tres membranas que muestra controles negativos y positivos, de acuerdo con diversas realizaciones. Las tiras de ensayo ejemplares distinguen fácilmente entre el control negativo (fetuina 0 mg/ml) y el control positivo (fetuina 5 mg/ml).

40 **Ejemplo 8: Métodos para determinar un estado glucémico en un sujeto**

45 En diversas realizaciones, los métodos y dispositivos de ensayo desvelados pueden usarse para determinar un estado glucémico en un sujeto, por ejemplo, diagnosticar una afección metabólica tal como diabetes, prediabetes o diabetes gestacional en un sujeto, o determinar un grado de control glucémico en un sujeto. En algunas realizaciones, puede obtenerse una muestra de saliva de un sujeto y someterse a los métodos desvelados en el presente documento o aplicarse a un dispositivo de ensayo como se desvela en el presente documento, tal como un dispositivo de flujo lateral. En algunas realizaciones, la muestra puede oxidarse y después aplicarse a un ensayo de tira reactiva (de dos membranas) como se desvela en el presente documento.

50 Los métodos y dispositivos de ensayo descritos en el presente documento pueden producir un resultado cuantificable que puede evaluarse visualmente o con la ayuda de un dispositivo de lectura colorimétrico. Una vez que se obtiene un resultado, este puede compararse con un patrón, tal como el ejemplo mostrado en la **Figura 12B**. Un resultado que sea significativamente mayor que un intervalo de referencia normal establecido puede indicar que el sujeto tiene diabetes, prediabetes o diabetes gestacional. En algunas realizaciones, los métodos y ensayos desvelados pueden usarse para determinar un estado glucémico en un sujeto, por ejemplo para establecer un grado basal de control glucémico (por ejemplo, una medición en un único punto que corresponde a un valor de glucosa en sangre promedio para el periodo de tres semanas precedente) o para supervisar cambios en el control glucémico a lo largo del tiempo (por ejemplo, para determinar si el control glucémico ha mejorado o se ha deteriorado durante un periodo de tiempo o en respuesta a un cambio de terapia). En este ejemplo, un resultado de ensayo que es mayor que un resultado de ensayo previo puede indicar empeoramiento del control glucémico, en el que un resultado de ensayo que es menor que un resultado de ensayo previo puede reflejar una mejora del control glucémico. En diversas realizaciones, el ensayo puede repetirse periódicamente, tal como cada tres semanas, cada seis semanas, cada tres meses, cada cuatro meses, cada seis meses o anualmente.

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar un estado glucémico en un sujeto, comprendiendo el método:
- 5 oxidar químicamente una muestra de saliva del sujeto, oxidando de este modo una o más glucoproteínas en la muestra de saliva para generar uno o más productos de oxidación, en el que la o las glucoproteínas comprenden ácido siálico y fucosa, y en el que el o los productos de oxidación comprenden uno o más aldehídos; y
- 10 cuantificar el o los aldehídos en la muestra de saliva oxidada, en el que un aumento significativo de una cantidad del o los aldehídos en relación con un intervalo de referencia normal indica que el sujeto tiene diabetes o prediabetes.
2. El método de la reivindicación 1 en el que la determinación del estado glucémico en el sujeto comprende determinar un valor de glucosa en sangre promedio para el sujeto, por ejemplo un valor de glucosa en sangre promedio de tres semanas.
- 15 3. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que el método proporciona información útil para diagnosticar diabetes en el sujeto.
4. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que el método es un método de supervisión del control glucémico en el sujeto.
- 20 5. El método de la reivindicación 1, en el que la oxidación de la muestra de saliva comprende hacer reaccionar la muestra de saliva con metaperyodato de sodio y/o en el que la oxidación de la muestra de saliva comprende aplicar la muestra de saliva a una membrana de metaperyodato de sodio.
- 25 6. El método de la reivindicación 1, en el que la cuantificación de aldehídos en la muestra de saliva oxidada comprende usar un método de detección química.
- 30 7. Un dispositivo de flujo lateral para detectar glucoproteínas en una muestra de saliva, comprendiendo el dispositivo de flujo lateral:
- una primera membrana que comprende metaperyodato de sodio;
- una segunda membrana en contacto operativo con la primera membrana, comprendiendo la segunda membrana NaOH;
- 35 una tercera membrana que comprende 4-amino-3-hidracino-5-mercapto-1,2,4-triazol (AHMT) inmovilizado; y una capa de malla dispuesta entre la segunda membrana y la tercera membrana.
8. El dispositivo de flujo lateral de la reivindicación 7, en el que la primera membrana se configura para oxidar ácido siálico y fucosa en la muestra de saliva.
- 40 9. El dispositivo de flujo lateral de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que la tercera membrana se configura para detectar aldehídos en la muestra de saliva oxidada y/o en el que la tercera membrana se configura para producir un resultado colorimétrico correspondiente a la cantidad de aldehídos en la muestra de saliva oxidada.
- 45 10. Un kit para detectar glucoproteínas en una muestra de saliva, comprendiendo el kit:
- un reactivo para oxidar glucoproteínas en una muestra de saliva;
- una tira de ensayo para detectar aldehídos en una muestra de saliva oxidada, comprendiendo la tira de ensayo:
- 50 una primera membrana que comprende NaOH;
- una segunda membrana que comprende 4-amino-3-hidracino-5-mercapto-1,2,4-triazol (AHMT) inmovilizado; y una capa de malla dispuesta entre la primera membrana y la segunda membrana; e instrucciones para usar el kit.
- 55 11. El kit de la reivindicación 10, en el que el reactivo para oxidar glucoproteínas en la muestra de saliva comprende metaperyodato de sodio y/o en el que el reactivo para oxidar glucoproteínas en la muestra de saliva comprende una membrana que comprende metaperyodato de sodio.
- 60 12. El kit de la reivindicación 10 o la reivindicación 11, que comprende además un colorímetro para leer la tira de ensayo.
13. El kit de la reivindicación 12, en el que el colorímetro se configura para generar un número correspondiente a la cantidad de aldehídos detectados por la tira de ensayo.
- 65 14. El kit de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en el que el número correspondiente a la cantidad de aldehídos detectados por la tira de ensayo varía de 4,0-12,0 y en el que un número mayor de 6,0 refleja un valor de

glucosa en sangre promedio elevado en comparación con un valor de glucosa en sangre promedio normal.

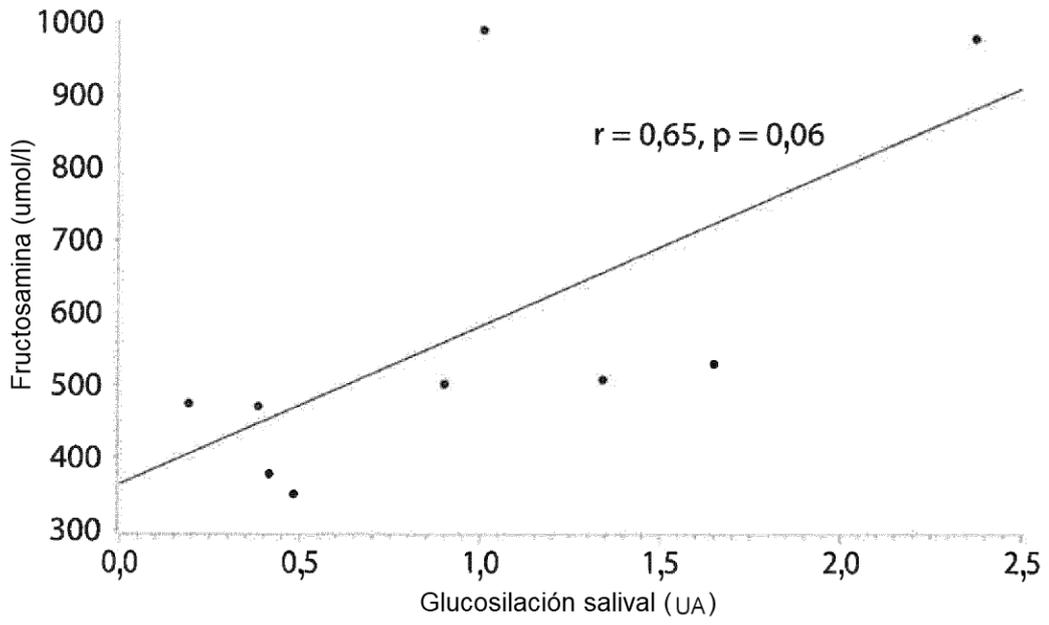


Figura 1A

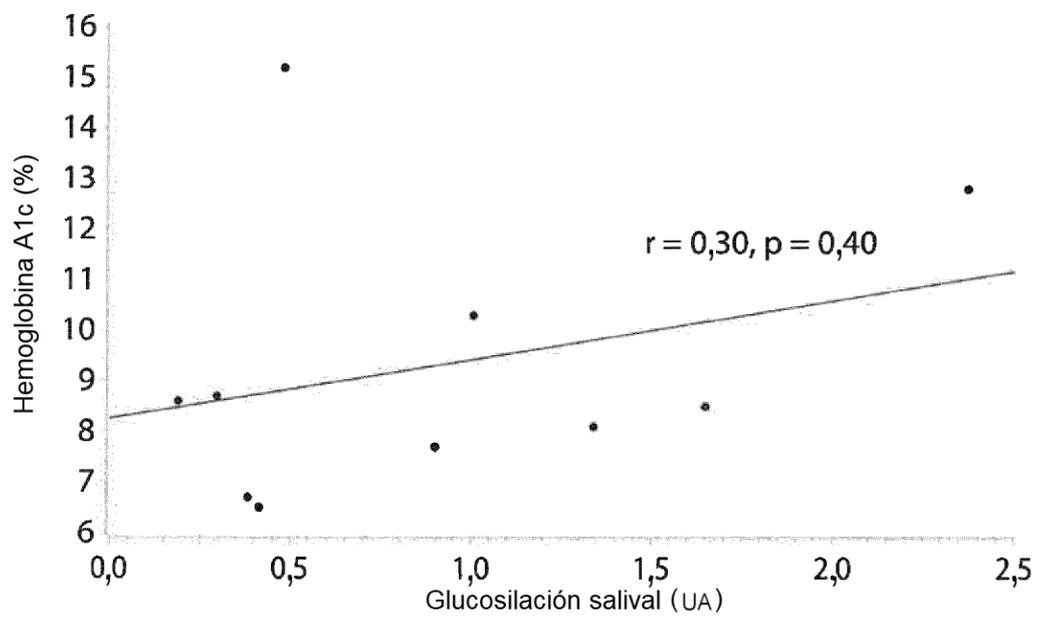


Figura 1B

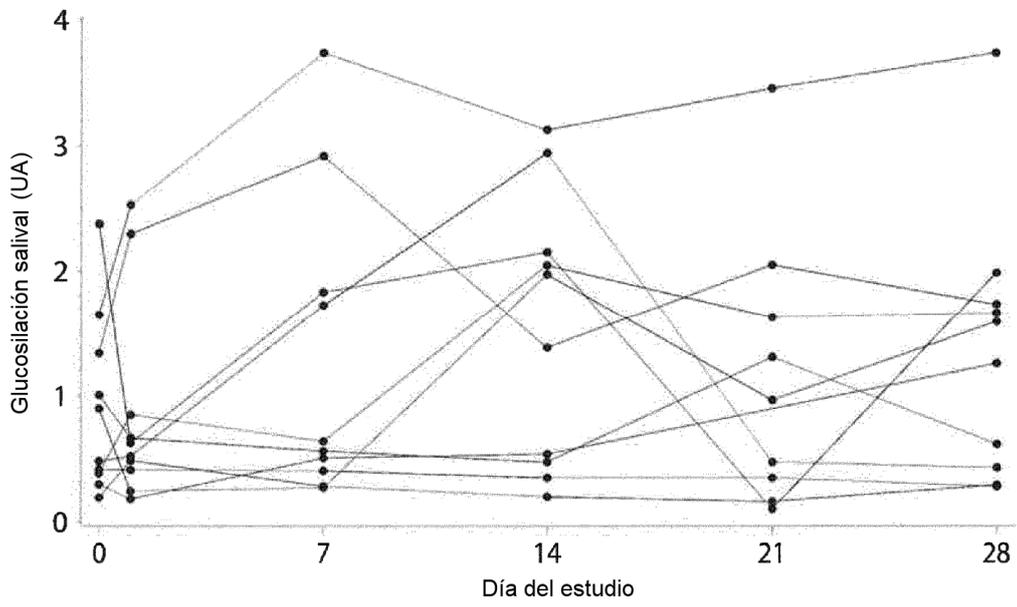


Figura 2

Figura 3A

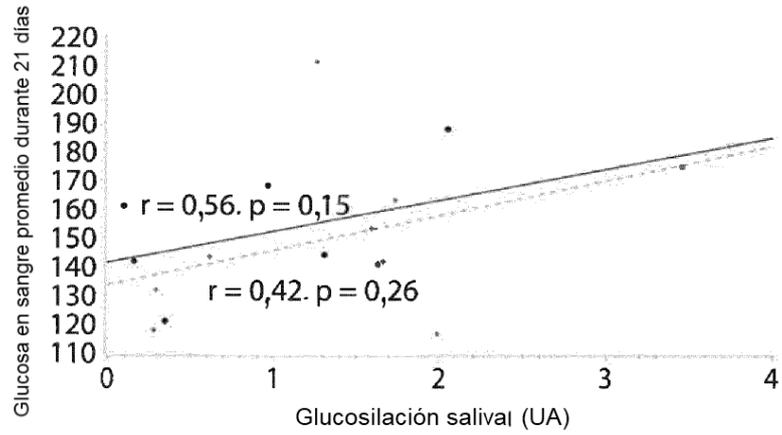


Figura 3B

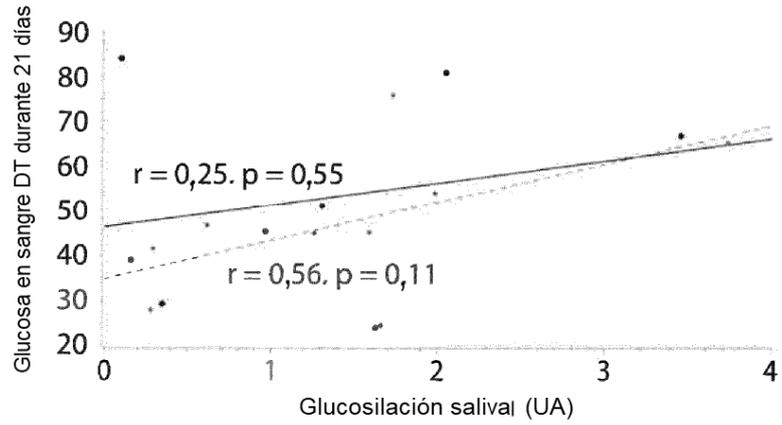


Figura 3C

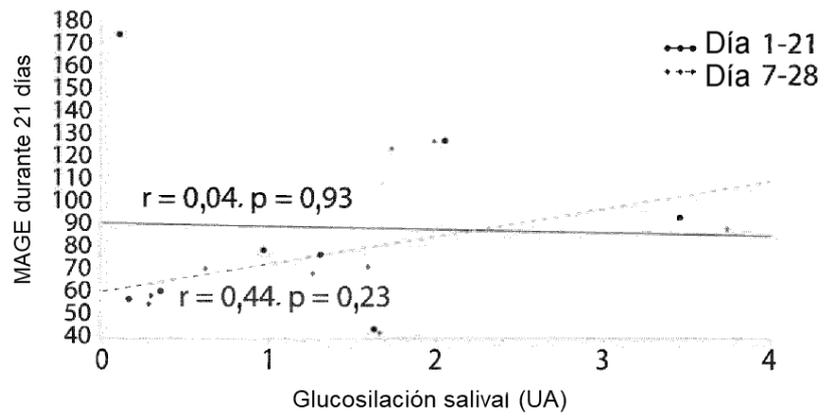


Figura 4A

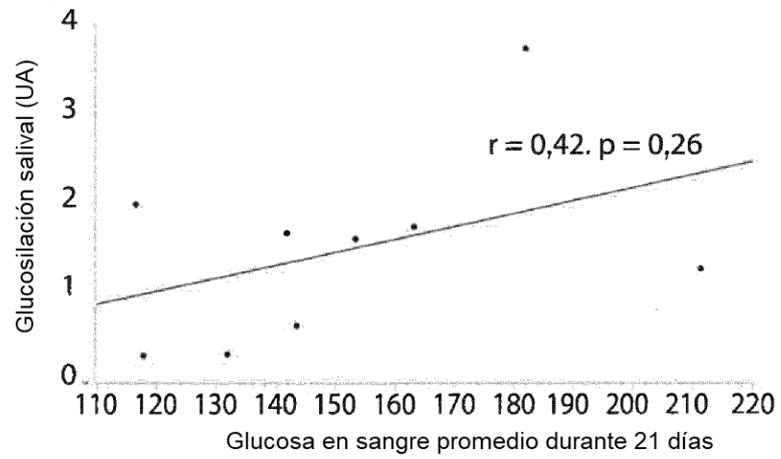


Figura 4B

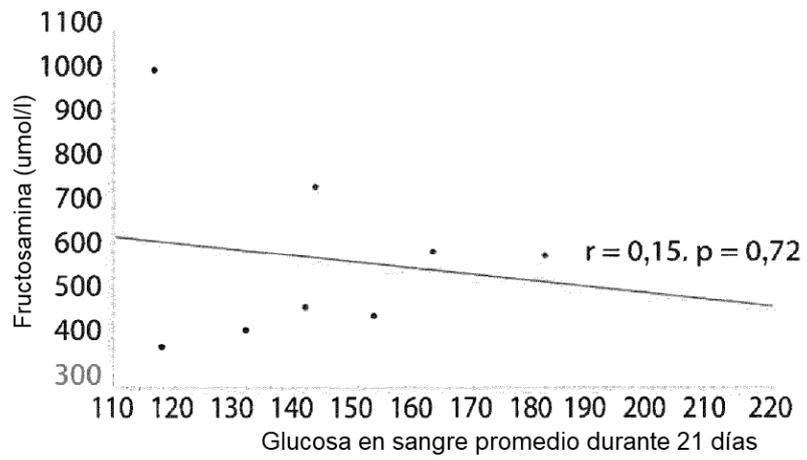
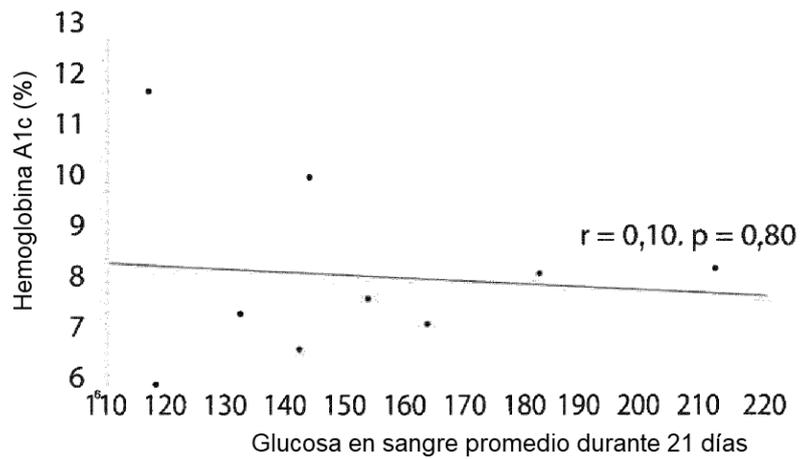


Figura 4C



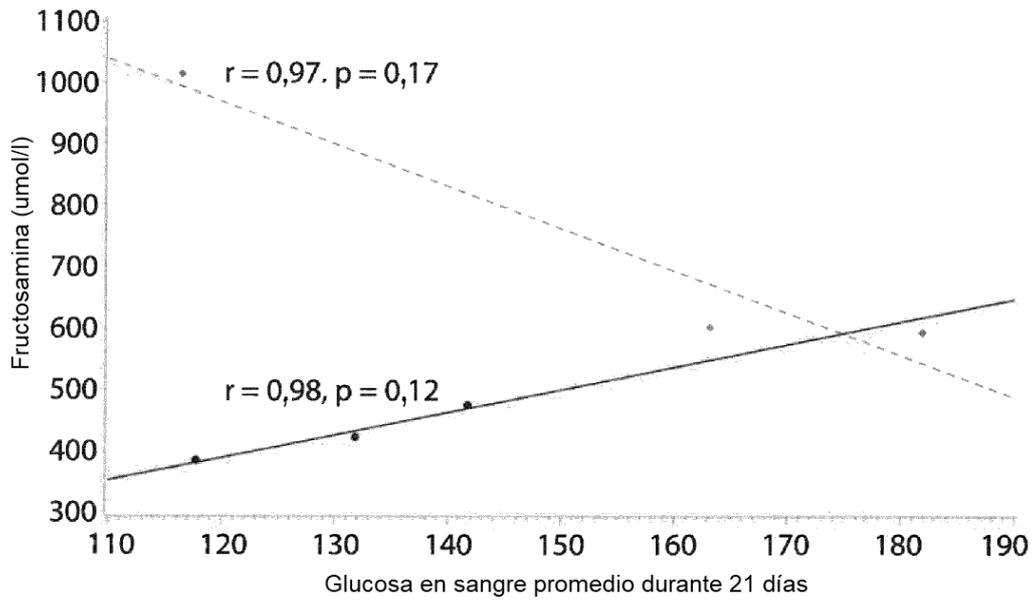


Figura 5A

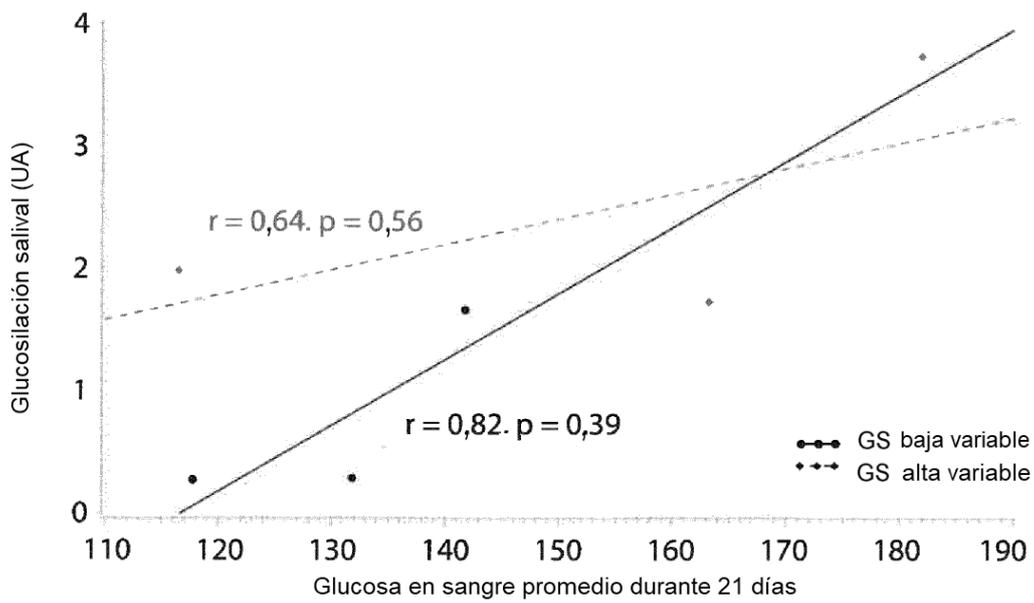
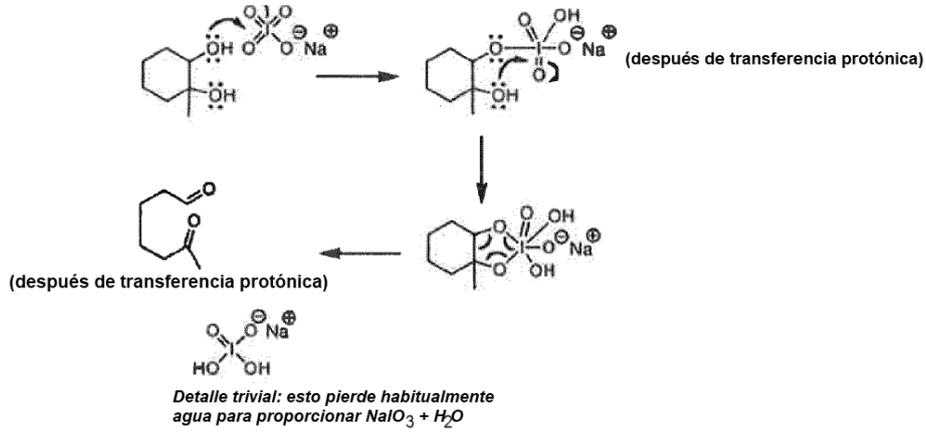


Figura 5B

La oxidación con peryodato de dioles adyacentes genera aldehídos



El ácido siálico y la fucosa se oxidan más fácilmente en las condiciones empleadas para saliva

Figura 6A

Reactividad de 4-amino-3-hidracino-5-mercapto-1,2,4-triazol con aldehídos (AHMT)

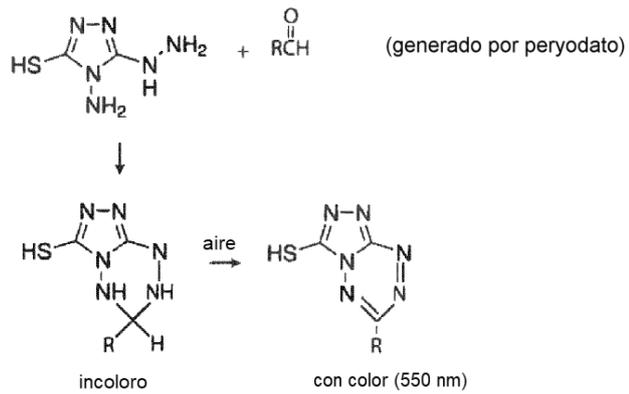


Figura 6B

Glucosilación salival total - Ensayo de placa

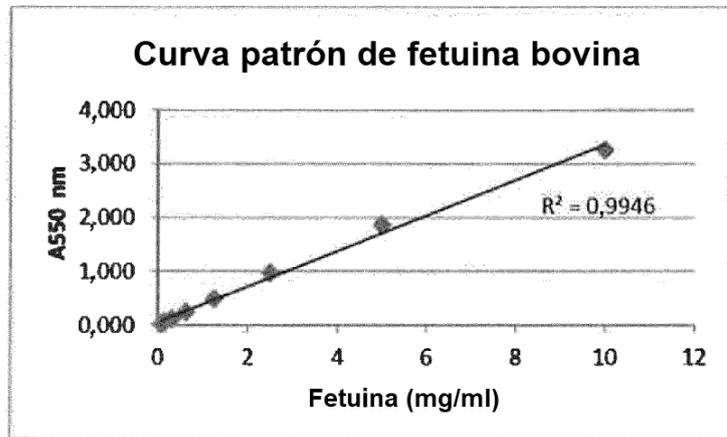


Figura 7A

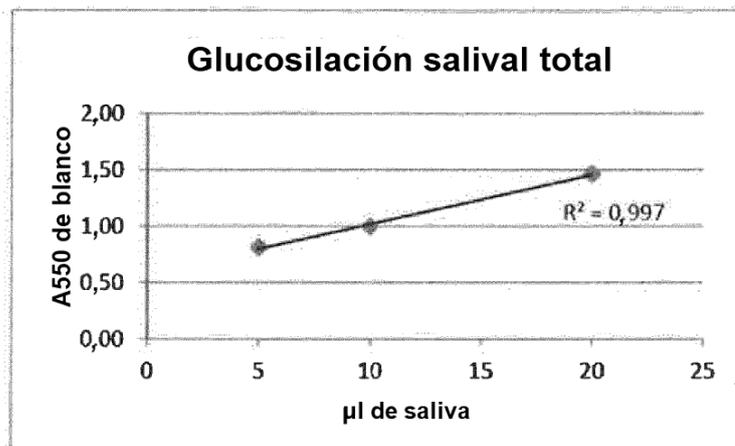


Figura 7B

Ensayo de fase sólida prototípico

1. AHMT immobilizado en membrana
2. Oxidación de la muestra de forma externa, adición de 20 μ l
3. Adición de 25 μ l de NaOH 2N

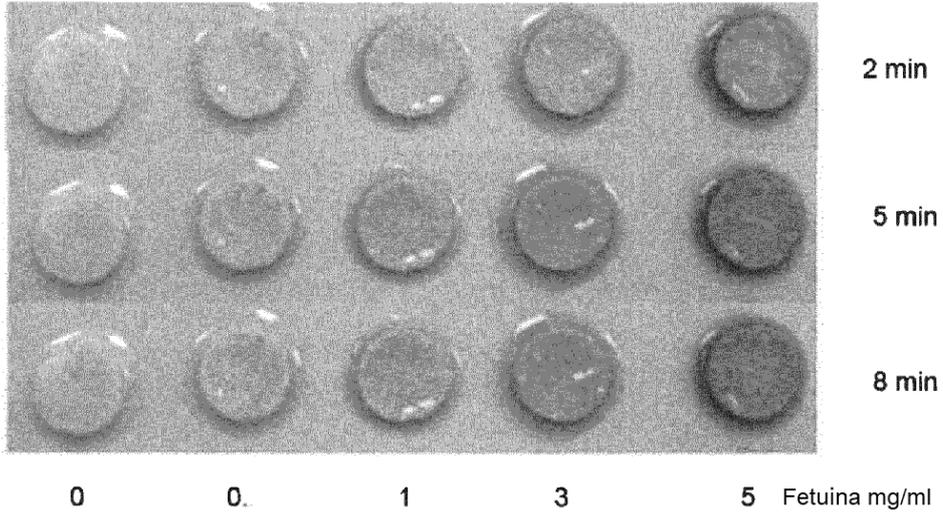


Figura 8A

Curva patrón de tira reactiva

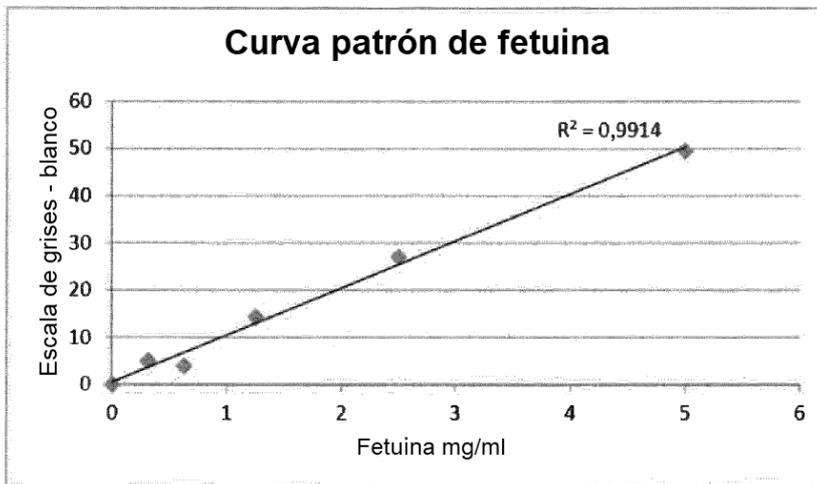


Figura 8B

Ciclo temporal de desarrollo de color

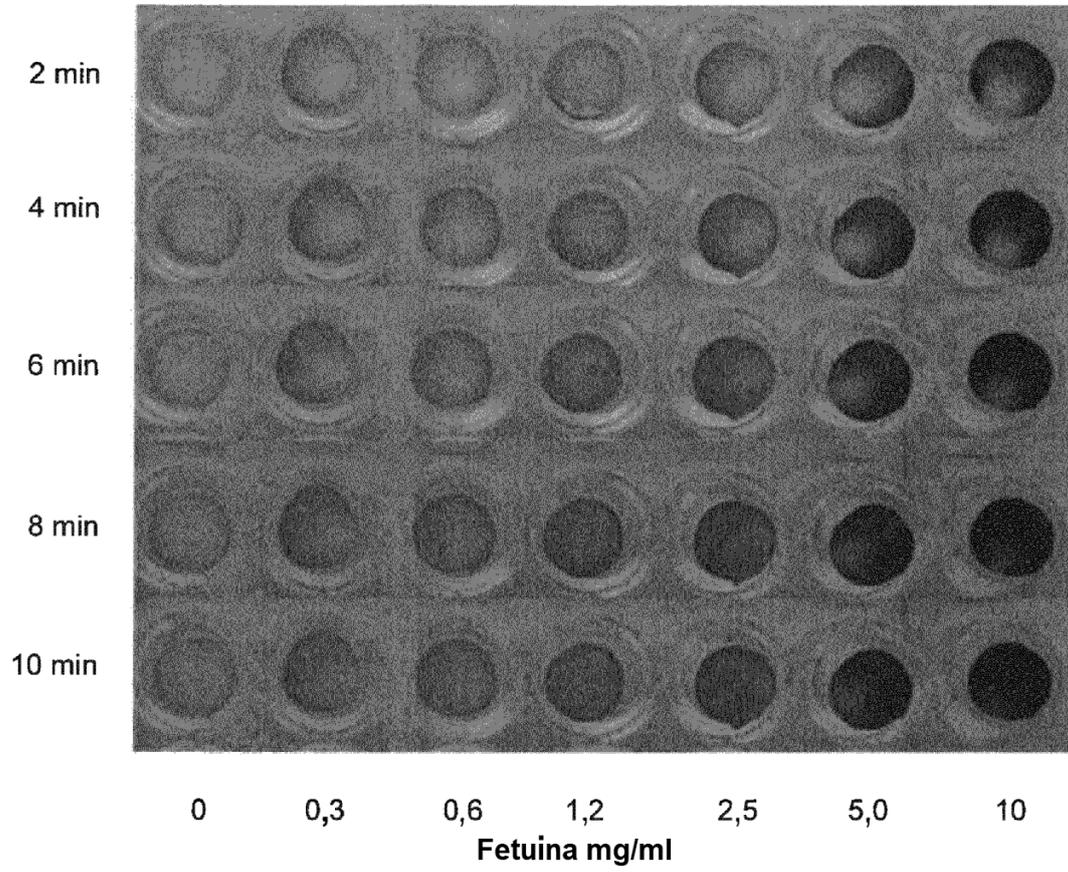


Figura 9A

Ciclo temporal de desarrollo de color

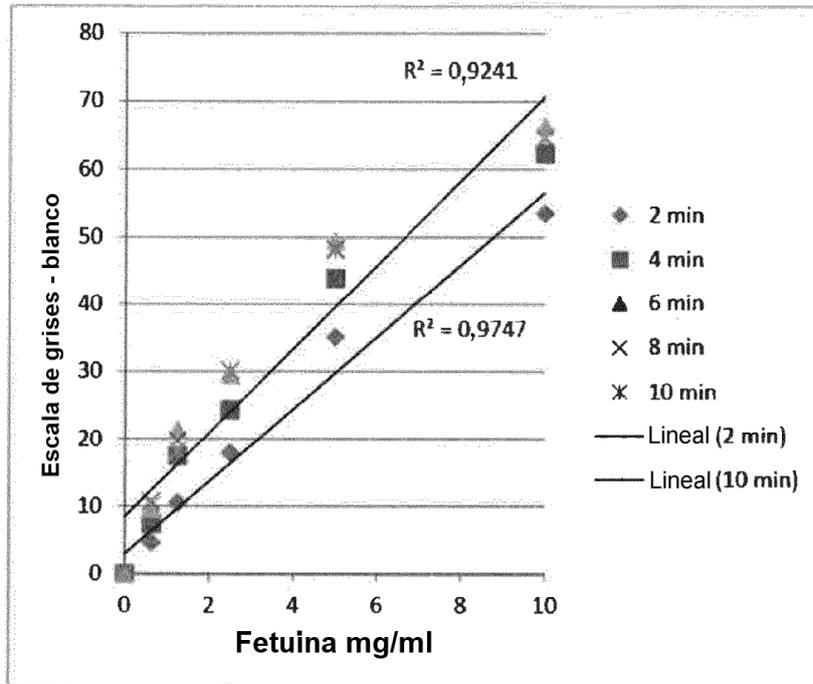


Figura 9B

Comparación de ensayos de placa y tira reactiva usando muestras de saliva

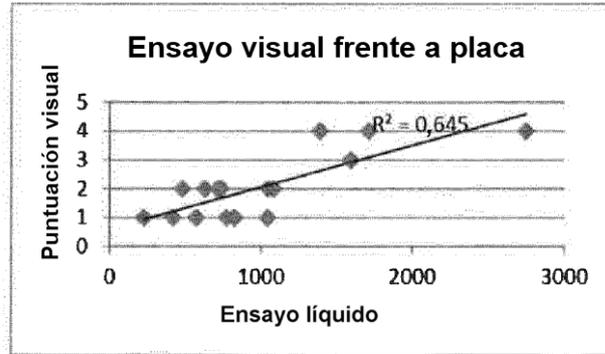


Figura 10A

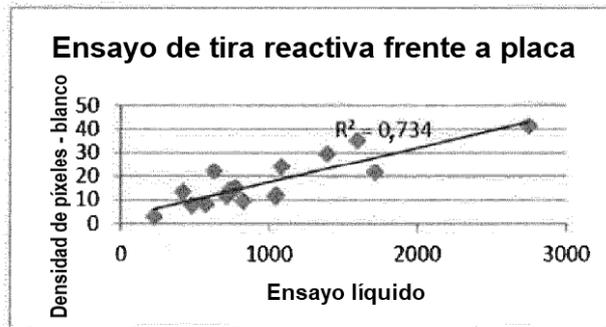


Figura 10B

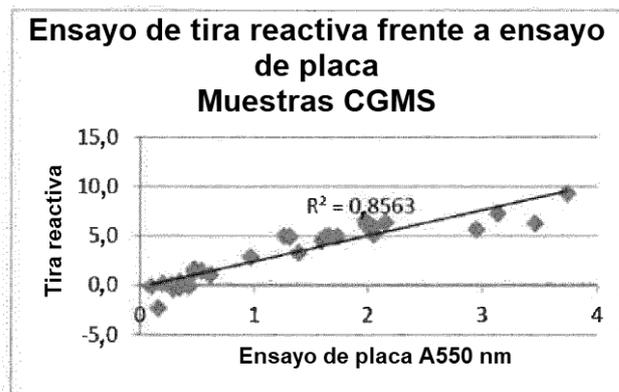


Figura 10C

Ensayo de tira reactiva de dos membranas

- Dispositivo de 2 membranas (AHMT + álcali)
- Oxidación externa (30 s)
- Adición de muestra, lectura después de 5 min

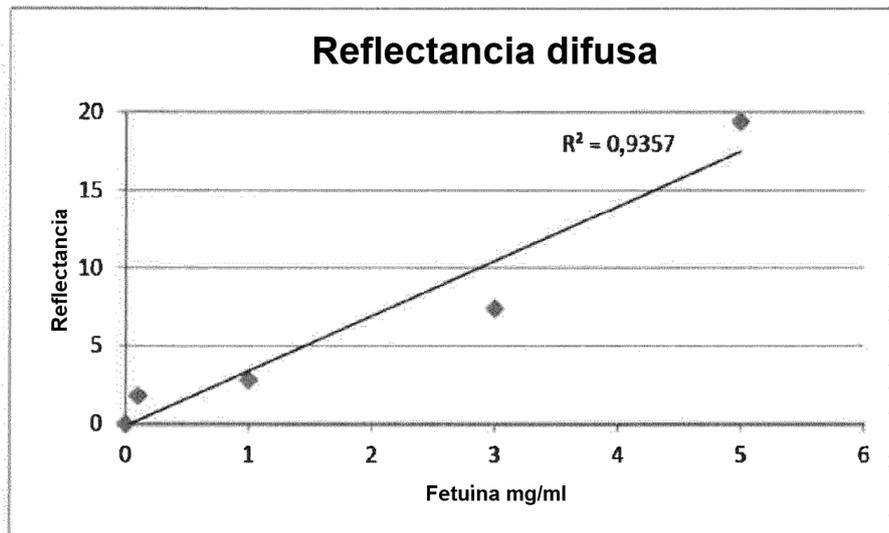


Figura 11A

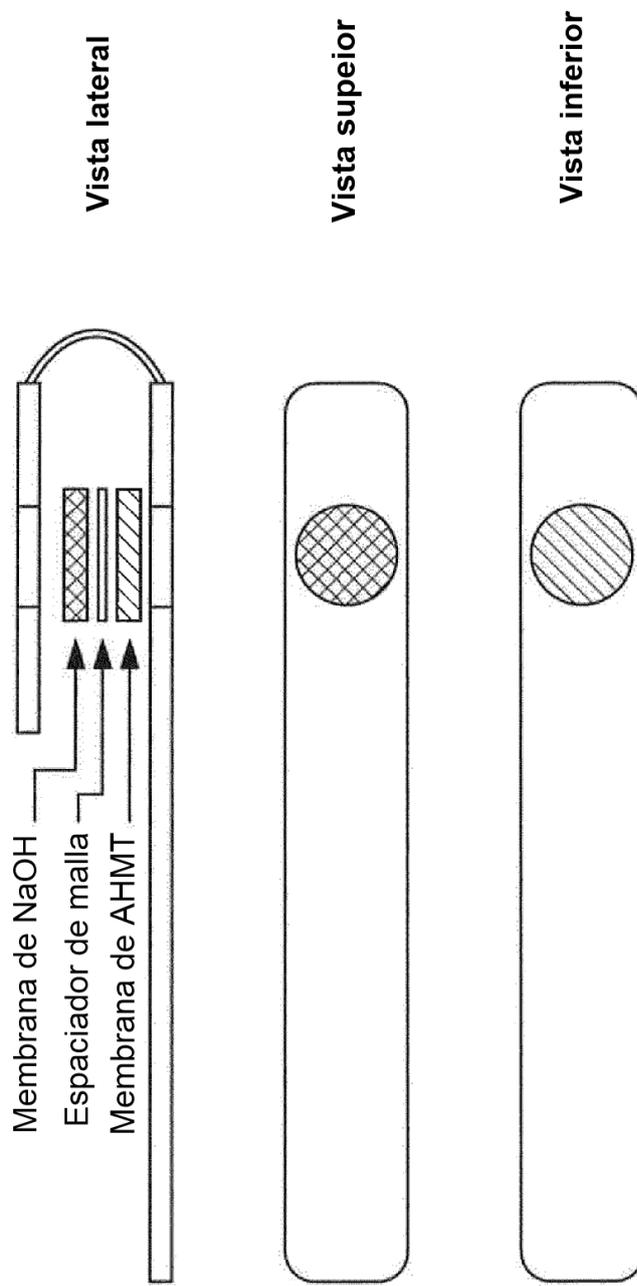


Figura 11B

Tira de ensayo de saliva para exploración y supervisión de control de la diabetes

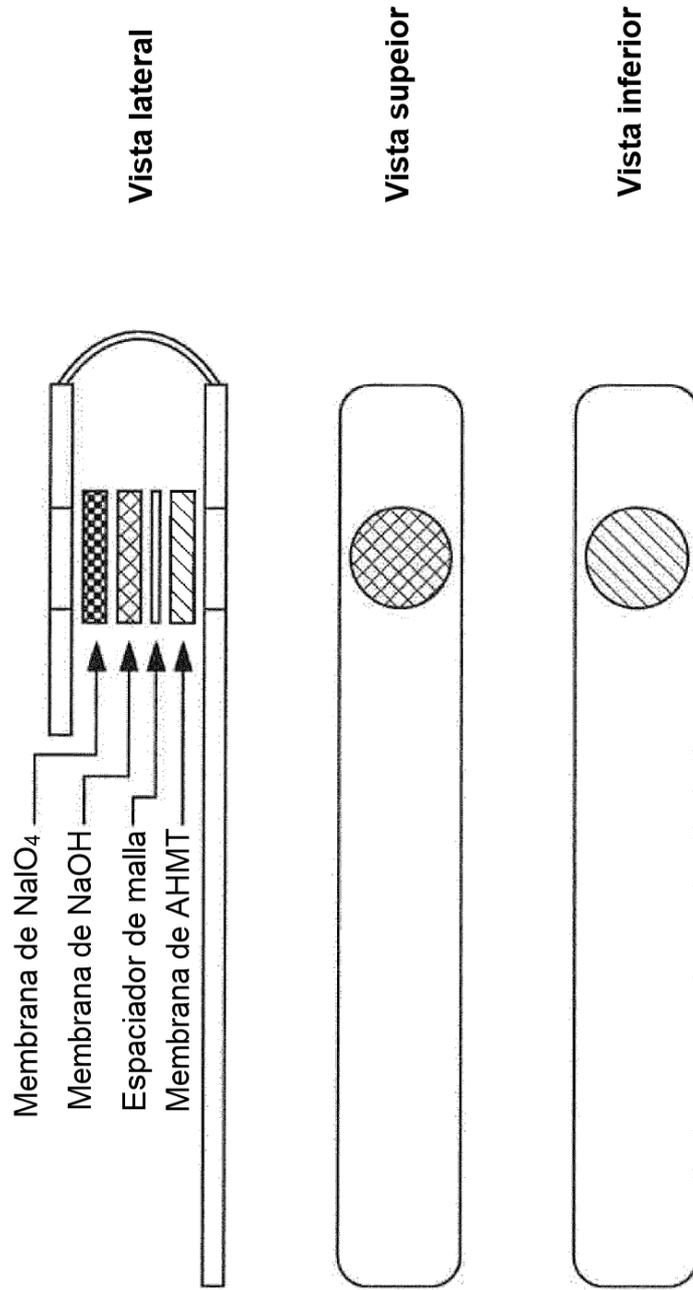
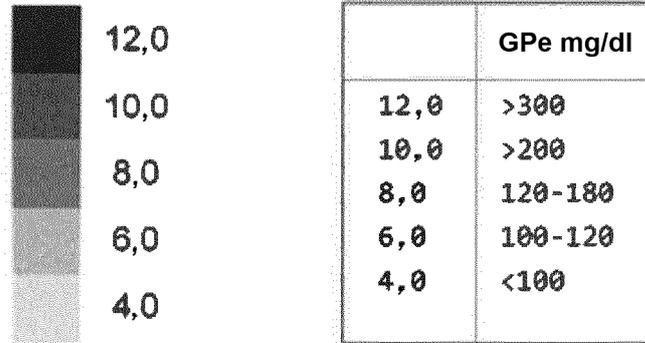


Figura 12A



Glucosa promedio estimada (GPe)

Figura 12B

**Evaluación de tira de ensayo de saliva de tres membranas (una etapa)
(% de reflectancia)**

Fetúina mg/ml	Concentración de peryodato sódico (mg/10 ml de tampón)		
	30	50	100
0	49,74	35,27	28,31
5	23,53	23,85	19,01

Figura 13A

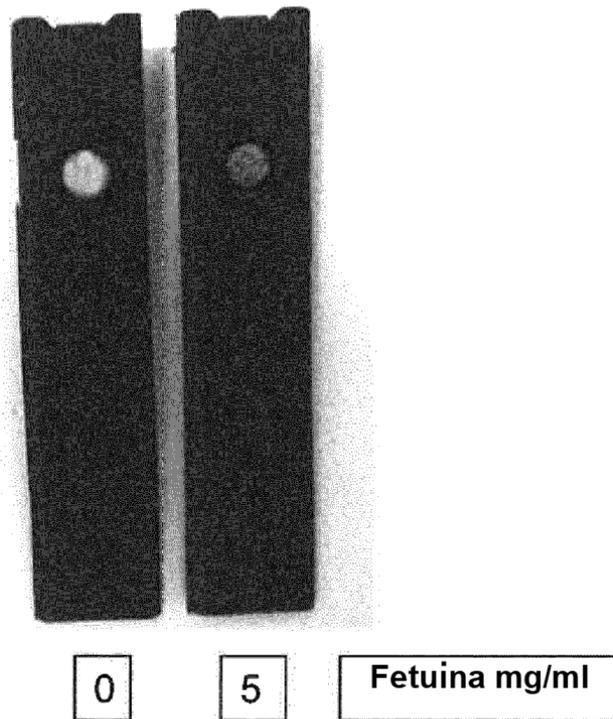


Figura 13B