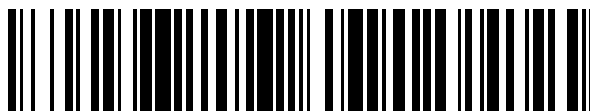


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 641**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/58** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/90** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2015 PCT/EP2015/054896**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15135900**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2015 E 15716745 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 3117217**

54 Título: **Método analítico para la identificación de al menos una glucoforma de la proteína transferrina**

30 Prioridad:

**12.03.2014 IT MI20140395**

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

**28.11.2018**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI VERONA (100.0%)  
Via dell'Artigliere 8  
37129 Verona, IT**

72 Inventor/es:

**DE PALO, ELIO FRANCO;  
TAGLIARO, FRANCO;  
SORIO, DANIELA y  
BORTOLOTTI, FEDERICA**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 691 641 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

Método analítico para la identificación de al menos una glucoforma de la proteína transferrina

5 La presente invención se refiere en general a un método analítico para la identificación de al menos una glucoforma y/o isoforma de transferrina, en particular con respecto a la transferrina deficiente en hidratos de carbono (TDH), posiblemente presente en una matriz biológica compleja, por contacto (funcionalización) de esta última con una fuente de ion lantánido 3+. El aducto de glucoforma-ion de lantánido formado puede identificarse mediante técnicas analíticas conocidas, preferentemente con detección de fluorescencia.

10

**Estado de la técnica**

15 La transferrina es una glucoproteína que tiene la función de transportar hierro en el organismo humano. Su estructura tiene dos dominios N y C terminales, cada uno de los cuales es capaz de unirse a un ion Fe<sup>3+</sup>. Por tanto, cada molécula de transferrina es capaz de unirse a dos iones de hierro, equilibrando la carga con un anión (anión sinérgico, por lo general carbonato) normalmente dependiendo del pH. En las personas clínicamente sanas ("normales"), el nivel de saturación de hierro en el suero humano es de aproximadamente el 30 %, lo que significa que la proteína todavía tiene un porcentaje de sitios libres, potencialmente capaces de interactuar con iones 3+.

20

La transferrina, en sus diversas isoformas, se caracteriza por una alta microheterogeneidad tanto de secuencia de glucosilación como de aminoácidos, así como de grupos siálicos. En particular, en su estructura, la molécula de transferrina comprende cadenas de glucano, cada una de las cuales termina por lo general con un resto de ácido siálico. Teóricamente, son posibles transferrinas con resto de ácido siálico de 0 hasta 8 (con puntos isoeléctricos (pI) comprendidos entre 5,1 y 5,9). Sin embargo, la principal glucoforma/sialoforma en suero humano (65-80 %) es la tetrasialo-transferrina, es decir, que tiene cuatro cadenas de glucano, por tanto, cuatro restos de ácido siálico y que tiene un pI de 5,4 (para una referencia general véase, por ejemplo, Schellenberg et al., *Clin Chem. Lab Med* 2013, 51 (5), 991-996).

25

30 Hay glucoformas de transferrina que revelan deficiencias en las cadenas de ácido glucídico y siálico y que pueden usarse como marcadores de diagnóstico. Dichas glucoformas (en general indicadas como TDH) se identificaron como: asialo-, mono- y di-asialo transferrina, que contienen respectivamente 0, 1 y 2 restos de ácido siálico. Además, estas glucoformas se caracterizan por valores de pI comprendidos entre 5,7 y 5,9.

30

35 Se observaron alteraciones de dichas formas en trastornos neurológicos congénitos atribuidos a la deficiencia de glucosilación de proteínas (SGDH - síndromes de glucosilación deficientes en hidratos de carbono). Incluso durante el embarazo se observó un ligero aumento de transferrinas deficientes en hidratos de carbono. Cuando se diagnostica abuso de alcohol, el uso de algunas de estas glucoformas como marcadores bioquímicos es ampliamente conocido. En particular, el aumento del componente disialo en el abuso de alcohol se atribuyó tanto a defectos de glucosilación como a un aumento de los procesos de desialización plasmáticos y de la membrana, lo que conduciría a una desialización parcial de la transferrina (véase, por ejemplo, van Eijk et al. *Clin Chim Acta*, 132, (1983), 167-171).

40

45 Por tanto, se desarrollaron y optimizaron métodos analíticos para la determinación cualitativa/cuantitativa de la cantidad de glucoformas de transferrina, con referencia particular a las isoformas TDH, como se define en detalle en el presente documento, en el campo del diagnóstico clínico y toxicológico.

45

50 Los documentos US4626355 y W095/04932 describen un método para la separación analítica de algunas TDH mediante la separación en fase sólida de intercambio iónico, en condiciones de pH controladas, para mantener algunas glucoformas en la columna, permitiendo la elución de las formas asialo, mono- y disialo.

50

El documento US5432059 desvela un método para la detección de glucoformas TDH mediante la reglucosilación de la proteína con una glucoproteína fluorescente, en presencia de reactivos y enzimas adecuados.

55 Además, se conocen métodos de detección de TDH que comprenden el uso de anticuerpos como marcadores biológicos, capaces de unirse selectivamente a TDH, permitiendo de este modo su posterior análisis.

55

60 El documento EP1378521 describe un método que comprende el uso de anticuerpos que, en un ambiente acuoso, son capaces de unirse a TDH, caracterizado porque es posible evitar el uso de las fases sólidas, como ocurre en general con este tipo de modificaciones (por ejemplo, véase el documento GB9827411).

60

65 Por tanto, existe la necesidad de encontrar un método que sea fácil de aplicar, que pueda ser adecuado para diferentes tipos de matrices biológicas complejas y que sea lo suficientemente sensible como para permitir detectar incluso variaciones ligeras de la cantidad de glucoformas de transferrina, con especial referencia a las transferrinas deficientes en hidratos de carbono, especialmente la disialo-transferrina.

65

La base de la presente invención es el descubrimiento de que es posible marcar la transferrina posiblemente

5 presente en una matriz biológica compleja, con un ion de lantánido 3+, obteniendo de este modo una proteína funcionalizada (aducto de transferrina-ion de lantánido 3+) que puede separarse en sus glucoformas y que puede usarse usando técnicas analíticas conocidas en la técnica. El presente método permite obtener una alta sensibilidad, permitiendo además identificar y medir las diversas glucoformas de transferrina, incluyendo TDH, desde el punto de vista tanto de la calidad como de la cantidad, proporcionando indicaciones importantes acerca del estado clínico del paciente, incluyendo también el posible abuso de alcohol.

### Sumario de la invención

10 La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas.

### Descripción de las figuras

15 Figura 1: Cromatograma de HPLC en modo de fluorescencia (exc 298, em 550 nm - mV frente a min) de suero humano con un valor alto de disialotransferrina derivatizada.

Figura 2: Electroferograma de EC en modo de fluorescencia (exc 280, em >460 nm - UFR frente a min) de suero humano derivatizado.

20 Figura 3: Cromatograma de HPLC en modo de fluorescencia (exc 298, em 550 nm - mV frente a min) de suero humano derivatizado.

### Descripción detallada

25 La expresión "separación y detección analítica" tiene por objeto indicar que las glucoformas de transferrina funcionalizadas con el ion de lantánido 3+, se identifican mediante separación cualitativa, por ejemplo, mediante cromatografía de acuerdo con sus tiempos de elución, y, por tanto, se detectan y se miden mediante detectores analíticos.

30 "Separación cuantitativa" significa que las glucoformas de transferrina también se separan y aíslan tras la identificación.

A menos que se especifique lo contrario, el término "TDH" indica la proteína transferrina deficiente en hidratos de carbono en las glucoformas: formas asialo, mono- y diasialo, posiblemente presentes en la matriz biológica analizada.

40 Como se ha mencionado anteriormente, dichas glucoformas tienen un número de restos de ácido siálico por debajo de 3 y un pI mayor o igual a 5,7. Se deben a la ausencia de uno o más restos de ácido siálico, que en su lugar están presentes en la proteína transferrina en condiciones fisiológicas "normales".

45 La expresión "glucoforma marcada o funcionalizada" tiene por objeto indicar la transferrina de glucoforma implicada (incluyendo las transferrinas deficientes en hidratos de carbono), funcionalizada con un ion de lantánido 3+, como se describe a continuación en el presente documento en detalle. En la práctica, debido al contacto entre la matriz biológica y la fuente de iones de lantánido, los sitios Fe<sup>3+</sup> libres de la proteína están ocupados, incluso hasta la saturación, por el ion de lantánido seleccionado, lo que conduce a la formación del aducto de proteína-lantánido, preferentemente aducto de TDH-ion de lantánido 3+.

50 Como se ha mencionado anteriormente, la invención se refiere a un método útil para la identificación de una o más glucoformas y/o isoformas y/o sialoformas de transferrina y, en particular, TDH en una matriz biológica compleja, que comprende el contacto de esta última con una fuente de iones de lantánido 3+ (etapa a.), la formación del aducto de proteína-ion de lantánido 3+, (etapa b.) y la posterior separación analítica y la detección de al menos una glucoforma de lantánido marcada (etapa c.). Ventajosamente, el presente método también permite medir variaciones porcentuales mínimas de las diversas glucoformas de transferrina, de una manera simple, precisa y reproducible.

55 La matriz biológica del presente método es preferentemente un fluido corporal humano o animal, prefiriéndose en particular el fluido corporal humano. Más preferentemente, la matriz biológica se selecciona entre: sangre, plasma, humor vítreo, saliva y, preferentemente, suero sanguíneo o líquido cefalorraquídeo (licor).

60 En una realización, la fuente de iones de lantánido 3+ comprende una sal orgánica o, preferentemente, inorgánica de un ion 3+ de un elemento seleccionado entre: europio (Eu), terbio (Tb), erbio (Er), praseodimio (Pr), iterbio (Yb), preferentemente terbio.

65 Las sales preferidas se seleccionan entre: cloruros, nitratos, acetilacetatos, nitriloacetatos (NTA) y acetatos, prefiriéndose en particular la sal de cloruro.

En general, la fuente de ion de lantánido 3+ es una solución orgánica o, preferentemente, acuosa, que comprende la

sal de un metal lantánido como se ha mencionado anteriormente. En el caso de soluciones orgánicas, estas soluciones se preparan disolviendo la sal en un disolvente orgánico seleccionado entre: acetonitrilo, tetrahidrofurano y, preferentemente, alcoholes con 1 a 4 átomos de carbono, prefiriéndose en particular el metanol. Las soluciones acuosas preferidas se obtienen disolviendo la sal en una solución salina, preferentemente en agua.

5 Las soluciones de ion de lantánido que pueden usarse en el presente método pueden tener concentraciones finales comprendidas entre 0,1 micromoles/l y 1 mM, por ejemplo, seleccionadas de acuerdo con el tipo de fluido o ion utilizado.

10 Antes de la etapa de contacto a., puede ser conveniente diluir la matriz biológica seleccionada con una solución diluyente, tal como, por ejemplo, agua o solución salina. En general, la matriz se diluye en proporciones comprendidas entre 1:2 y 1:10, dependiendo del tipo de técnica analítica que se pretende utilizar y/o dependiendo de la composición y las características químicas/físicas de la matriz. Esta dilución es útil para optimizar el análisis teniendo en cuenta el efecto de inactivación, la saturación de la cantidad de muestras utilizadas y también la  
15 salvaguarda de los sistemas analíticos utilizados. Posiblemente, la muestra también puede añadirse con un agente estabilizador adecuado que tenga principalmente la función de quelar el hierro libre, es decir, que no esté unido a la proteína. El agente estabilizante puede añadirse durante la preparación de la muestra o incluso directamente en la fase de elución, en el caso de un análisis por HPLC. En cualquier caso, la presencia del estabilizador permite obtener una mejor señal, garantizando de este modo soluciones de la muestra con mayor estabilidad, ya que reduce  
20 considerablemente la formación del hidróxido derivado del lantánido seleccionado, que de otro modo podría formarse. Los agentes quelantes adecuados pueden seleccionarse entre: EDTA, deferoxamina B (FeDFO, por ejemplo, comercializada con el nombre Desferal, sal de mesilato) y similares. El contacto de acuerdo con la etapa a. puede ocurrir a temperatura ambiente (aproximadamente entre 15 °C y 40 °C), por ejemplo, mezclando un fluido corporal humano, posiblemente diluido, y una solución acuosa que contenga cloruro de terbio, en presencia de  
25 deferoxamina B.

La mezcla se deja en reposo durante un período de incubación, para permitir la funcionalización de las glucoformas de transferrina, con ion de lantánido 3+, de acuerdo con la etapa b. Dicho período de incubación permite la  
30 formación del aducto de proteína-ion de lantánido 3+, preferentemente mediante la saturación de los sitios de unión a Fe3+ libres, y también puede realizarse en períodos de tiempo muy cortos, es decir, en el orden de 4 o 5 minutos.

Se observa que el aducto formado en la etapa b. es estable a lo largo del tiempo y también puede conservarse durante varios días, sin interferir sustancialmente con el análisis y la composición del fluido corporal tratado. Posiblemente, al final de la etapa b., es posible realizar una etapa intermedia de separación sólido/líquido, por  
35 ejemplo, mediante centrifugación, realizada en general cuando la muestra revela impurezas u opalescencia que podrían afectar la facilidad de ejecución del ensayo o podrían poner en peligro de alguna manera la sensibilidad del método.

La muestra que contiene el aducto de transferrina-ion de lantánido 3+ se somete de este modo a la separación analítica y la detección de acuerdo con la etapa c.

Preferentemente, en la etapa c. se identifican las glucoformas de asialo, mono- y disialo-transferrina (es decir, las transferrinas deficientes en hidratos de carbono indicadas en el presente documento con TDH), prefiriéndose en particular la glucoforma disialo.

45 A este respecto, pueden usarse ventajosamente técnicas analíticas e instrumentos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, seleccionados de acuerdo con el tipo de matriz utilizada o la cantidad disponible de muestra (para una referencia general véase *Biochimica Clinica*, 2006, vol. 30, n.º 3 páginas 203-209). Preferentemente, la etapa c. del presente método comprende la separación analítica por HPLC o electroforesis capilar (EC). En el caso  
50 de la separación por HPLC, la fase eluyente puede contener un compuesto adecuado útil como agente de par iónico para la carga negativa secundaria, permitiendo de este modo una mejor resolución de la señal final. Preferentemente, dicho compuesto es 1,4-diaminobutano (DAB). En el caso de la separación por CE, el tampón de funcionamiento puede contener un compuesto de recubrimiento para reducir las interacciones iónicas entre las paredes del capilar y el analito iónico que se ha de separar, preferentemente dicho compuesto es DAB.

55 A modo de ejemplo no limitante, la separación analítica de una o más glucoformas del aducto de TDH-ion de lantánido 3+ de acuerdo con el presente método puede producirse mediante el uso de una columna de HPLC de intercambio aniónico débil, eluyendo en gradiente de concentración con una solución tampón con un pH, por ejemplo, comprendido entre 6 y 9, en presencia de posibles estabilizantes o agentes secuestrantes. Aún a modo de  
60 ejemplo, en el caso del análisis por CE, pueden usarse capilares con un diámetro de 25-50 micrómetros, con una longitud comprendida entre 20-100 cm, usando un tampón de borato o similar, que posiblemente contengan trazas de la sal del ion de lantánido 3+, preferentemente en cantidades comprendidas entre 0,1 y 1000 micromoles/l.

65 En una realización igualmente preferida, la etapa c. comprende la detección analítica y la medición de glucoformas de transferrina por fluorescencia.

El uso de un detector de fluorescencia, con longitudes de onda de excitación y emisión adecuadas, es particularmente conveniente ya que permite obtener una sensibilidad y especificidad de detección óptimas, capaces de medir incluso ligeras variaciones porcentuales de las diversas glucoformas de transferrina, incluyendo las TDH.

- 5 Las condiciones finales típicas de los detectores de fluorescencia utilizados pueden ser una excitación (ex) comprendida entre 250-320 nm y una emisión (em) mayor o igual a 400 nm para HPLC y EC.

Hasta este punto, la figura 1 muestra un cromatograma de HPLC de un suero humano tratado con una solución acuosa de cloruro de terbio obtenida con una detección de fluorescencia a ex298 em550 nm. Pueden observarse las  
10 señales de disialo- (aproximadamente 13 min), trisialo- (aproximadamente 14 min); tetrasialo- (aproximadamente 15-16 min) y pentasialo-transferrina (entre 17 y 18 min).

La Figura 2, muestra un electroferograma de fluorescencia de una muestra de suero tratada con una solución acuosa de cloruro de terbio, en el que pueden identificarse las señales deficientes en hidratos de carbono de di-, tri-  
15 sialo (a los 23 y 24 min respectivamente) así como las formas de tetra- y penta-sialo transferrina (de 24,5 a aproximadamente 26 min).

Como puede observarse en las figuras 1-2, la presencia de grandes cantidades de tetrasialotransferrina puede usarse como patrón interno en los tiempos de elución/migración, con el objetivo de obtener una identificación más  
20 precisa de los otros componentes mediante la medición de los tiempos relativos.

Además de la alta sensibilidad, el presente método permite obtener gráficos (cromatogramas/electroferogramas) en los cuales los efectos de la interferencia, provocados por el tipo de la matriz biológica analizada, son totalmente  
25 marginales, contrariamente a lo observado en los métodos de la técnica anterior. Respecto a esto, véase por ejemplo la figura 2, en la que puede observarse la ausencia de señales de interferencia, macroscópicamente evidentes en el análisis ejecutado usando métodos convencionales a través de la detección UV. Esto sugiere que el presente método también es potencialmente aplicable a matrices biológicas diferentes del suero humano o la sangre en general garantizando, sin embargo, resultados óptimos tanto en términos de claridad como de sensibilidad.

La medición de las áreas de los picos cromatográficos permite calcular ventajosamente los porcentajes de las glucoformas detectadas y, de este modo, obtener información importante acerca del cuadro clínico/toxicológico del individuo objeto de estudio, por ejemplo, con respecto a los valores obtenidos usando la misma matriz biológica en  
30 sujetos de referencia sanos. En la práctica, los valores con respecto a una glucoforma, medidos usando el presente método, corresponden al valor porcentual del pico relativo, con respecto a la cantidad de proteína total. Por ejemplo, como se ilustra en la figura 3, considerando las áreas de disialo (56786, a 12,7 min), trisialo (592805, a 13,9 min) y tetra+pentasialo (10487682, a 16,4 min), el porcentaje de glucoforma de disialo calculada es del 0,51 % del área total.

En una realización adicional, el presente método puede comprender una posible etapa para la separación cuantitativa d., por ejemplo, de una o más glucoformas y/o isoformas de TDH, normalmente mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, columnas preparativas y similares.40

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso del presente método para la identificación de posibles enfermedades o afecciones clínicas asociadas a la presencia de una o más glucoformas, preferentemente TDH, en particular la glucoforma disialo. Cuando la matriz biológica en cuestión es humana, el presente método es adecuado para diagnosticar una afección de adicción o abuso de alcohol de la persona objeto del análisis.  
45

Por tanto, la invención también se refiere a un método de diagnóstico para la detección de enfermedades o afecciones clínicas asociadas a la presencia de al menos una glucoforma y/o isoforma de transferrina en un ser vivo, preferentemente humano, que comprende:  
50

- recoger una muestra de fluido humano, seleccionada como se ha indicado anteriormente;
- poner en contacto dicha muestra con una fuente de ion de lantánido 3+, como se ha indicado anteriormente;
- separación analítica y detección de al menos una transferrina y/o isoforma de glucoforma como se ha indicado  
55 anteriormente;
- posible comparación de los valores obtenidos con valores medidos en sujetos de referencia sanos.

La expresión "sujetos sanos" tiene por objeto indicar seres humanos que tienen glucoformas deficientes en hidratos de carbono y, en particular, glucoformas disialo, que son normales y no pueden asociarse a condiciones clínicas/toxicológicas alteradas.  
60

Además de la alta sensibilidad, el presente método también se caracteriza por la facilidad de ejecución, ya que no se requieren reactivos particulares o tratamientos preliminares de la muestra que se analiza. Además, la posibilidad de utilizar técnicas analíticas con detección de fluorescencia también permite analizar cantidades limitadas de muestras biológicas, lo que garantiza una alta fiabilidad del método. En realidad, en caso de supuestos resultados positivos, no es necesario realizar un ensayo de confirmación como sí se requiere en algunos métodos de diagnóstico de la  
65

técnica anterior.

Una ventaja adicional reside en el hecho de que el presente método también puede adaptarse a diferentes tipos de matrices biológicas complejas, haciendo que la invención sea extremadamente versátil y de amplia aplicabilidad.

5

La invención se describirá ahora con la siguiente parte experimental, destinada a fines ilustrativos y no limitantes.

#### **PARTE EXPERIMENTAL**

##### **10 Ejemplo 1.1: preparación del aducto de transferrina-ion de lantánido 3+ de acuerdo con el método de la invención.**

Muestra: 40 microlitros de muestra de suero (o Apo convencional a la concentración de aproximadamente 10 micromoles/l o control en uso con los métodos convencionales) a los que se les añadieron 8 microlitros de una solución salina acuosa de la sal de cloruro de lantánido (concentración final de aproximadamente 500 micromoles/l), adición posterior de 15 microlitros de estabilizador Deferoxamina B (FeDFO, por ejemplo, comercializada con el nombre Desferal, sal de mesilato) y adición de agua para un volumen final de 150 microlitros.

15

##### **20 Ejemplo 1.2: detección del aducto del ejemplo 1.1 por HPLC (figura 1).**

La columna utilizada es una columna WAX (CLINREP de intercambio aniónico débil) de 4,6 x 5 mm x cm con una columna de protección específica y un filtro de 0,22 micrómetros y un termostato a 50 °C. Flujo de 1 ml/min. Fase móvil de tampón Tris 20 mM a un pH comprendido entre aproximadamente 7 y 9, con adición de NaCl 0,5 M y DAB (1,4 diaminobutano) 18 mM. Gradiente de la fase B del 0 al 20 %. La fase A también contiene el estabilizador Deferoxamina B (FeDFO, desferal) a la concentración de 50-100 micromoles/l.

20

25

Al final de la ejecución, la columna se regenera utilizando una solución de cloruro de sodio 2 M. Duración total del análisis de aproximadamente 40 min.

30

Estas condiciones se sometieron a ensayo en una muestra de suero humano tratada con cloruro de terbio y el cromatograma se indica en la figura 1.

##### **Ejemplo 1.3: detección del aducto del ejemplo 1.1. a través de análisis por EC (figura 2).**

Datos preliminares revelaron las isoformas di-, tri-, tetra- y penta-sialo transferrina. El detector de fluorescencia en uso es del tipo LED. Los ensayos ejecutados usaron capilares con un diámetro de 50 micrómetros, longitud de aproximadamente 50-70 cm. El tampón de ejecución es un tampón de borato, pH 7-9, 120 mM que contiene DAB 6 mM, las separaciones se ejecutaron con ddp de 30 kV. La muestra se inyecta a presión (0,5 psi (3,45 kPa)) y la operación de separación dura aproximadamente 30 minutos. El tratamiento de la muestra es completamente similar al que se proporciona para el análisis por HPLC del ejemplo 1.2, es decir: suero (convencional o de control), adición de solución salina de lantánido (500 micromoles/l finales en la muestra inyectada).

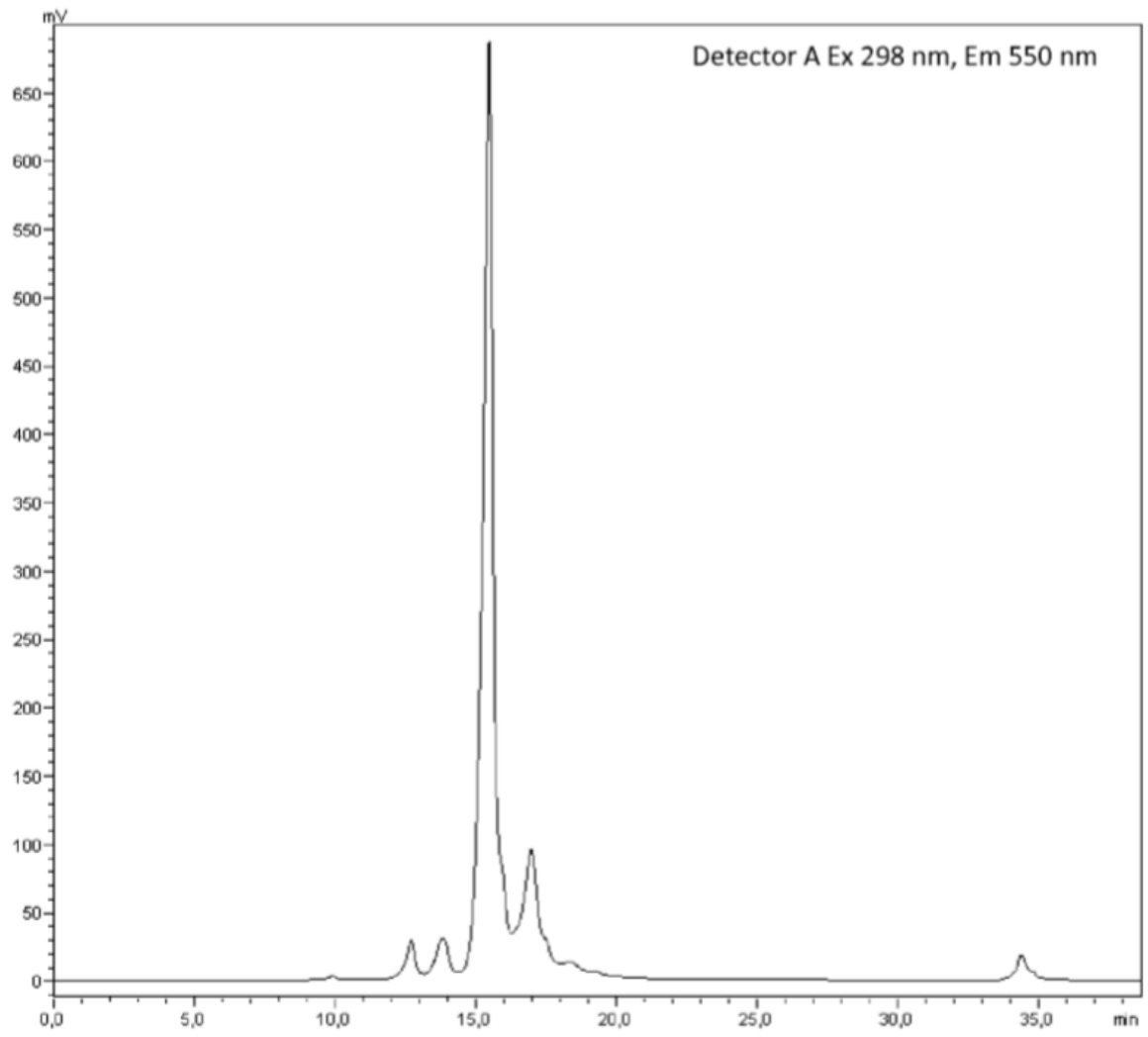
35

40

La Figura 2 indica el espectro de EC obtenido usando una muestra de suero tratada con cloruro de terbio.

## REIVINDICACIONES

1. Método para la identificación de al menos una glucoforma y/o isoforma de transferrina posiblemente presente en una matriz biológica compleja, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 5 a. poner en contacto una muestra de dicha matriz con una fuente de ion de lantánido 3+, en el que la fuente de ion 3+ lantánido es una solución orgánica o acuosa que comprende una sal de un ion +3 de un elemento seleccionado entre europio, erbio, praseodimio, iterbio y, preferentemente, terbio, obteniendo una mezcla;
- 10 b. dejar dicha mezcla en reposo durante un período de incubación para permitir la funcionalización, con ion de lantánido 3+, de al menos una glucoforma y/o isoforma de transferrina, formando el aducto de transferrina-ion de lantánido 3+;
- c. separación analítica mediante análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o por electroforesis capilar (CE) y medición y detección por fluorescencia de dicha al menos una glucoforma y/o isoforma funcionalizada.
- 15 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1 para la identificación y, posiblemente, la medición, de al menos una glucoforma de transferrina, preferentemente transferrina deficiente en hidratos de carbono, seleccionada entre: asialo-, monosialo-, disialo-transferrina.
3. Método de acuerdo con la reivindicación 2, para la identificación y medición de la disialo-transferrina.
- 20 4. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en el que dicha matriz biológica es un fluido corporal animal o, preferentemente, humano.
5. Método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho fluido se selecciona entre: plasma, sangre, humor vítreo, saliva y preferentemente suero sanguíneo o fluido cefalorraquídeo.
- 25 6. Método de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, en el que dicha fuente de iones de lantánido 3+ es una solución orgánica o acuosa de una sal de lantánido 3+ seleccionada entre: nitratos, acetatos, acetilacetatos, nitriloacetatos y preferentemente cloruros.
- 30 7. Método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha fuente es una solución acuosa obtenida disolviendo la sal del ion de lantánido en una solución salina.
8. Método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha fuente es una solución orgánica obtenida disolviendo la sal del ion de lantánido en un disolvente orgánico seleccionado entre: acetonitrilo, tetrahidrofurano, alcoholes con de 1 a 4 átomos de carbono, preferentemente metanol.
- 35 9. Método de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, en el que la funcionalización de acuerdo con la etapa b. se produce mediante la saturación de los sitios de unión a Fe<sup>3+</sup> libres de al menos una glucoforma de transferrina, preferentemente transferrina deficiente en hidratos de carbono, con un ion de lantánido 3+.
- 40 10. Método de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente una etapa d. para la separación cuantitativa de al menos una glucoforma detectada en la etapa c.
- 45 11. Método de acuerdo con las reivindicaciones anteriores, para la determinación de un estado clínico/toxicológico asociado a la presencia de al menos una glucoforma de transferrina, preferentemente transferrina deficiente en hidratos de carbono.
12. Método de acuerdo con la reivindicación 11, para la detección de una afección de abuso de alcohol o adicción en un ser humano.
- 50



**Fig.1**



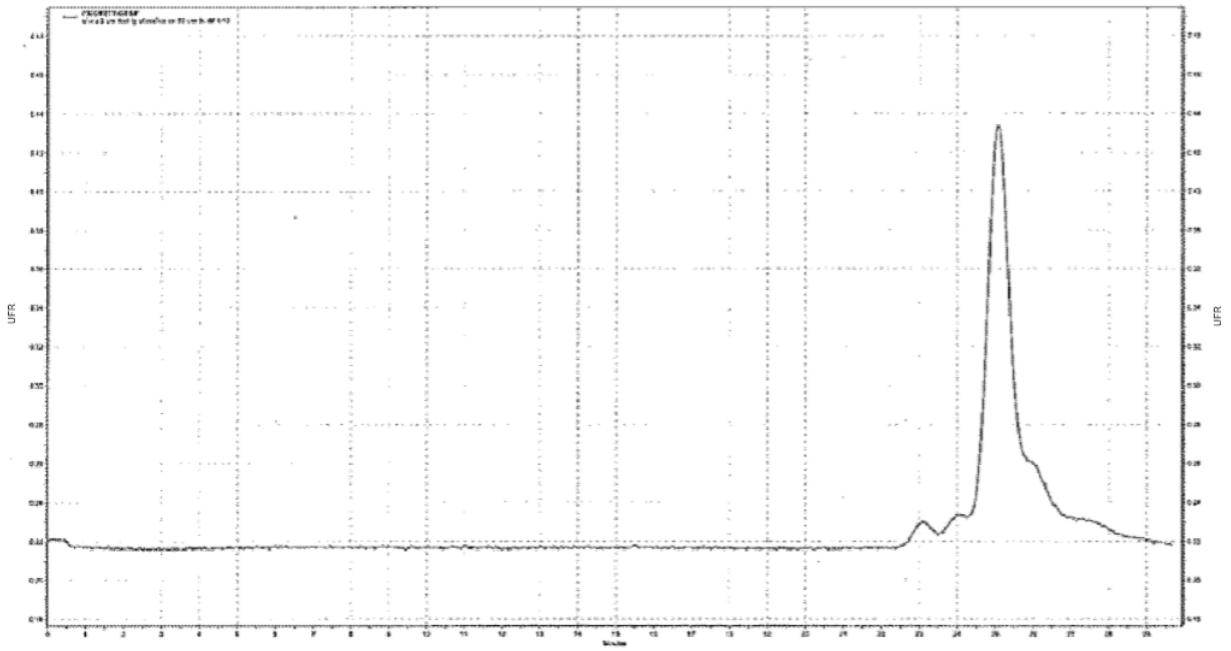


Fig.2

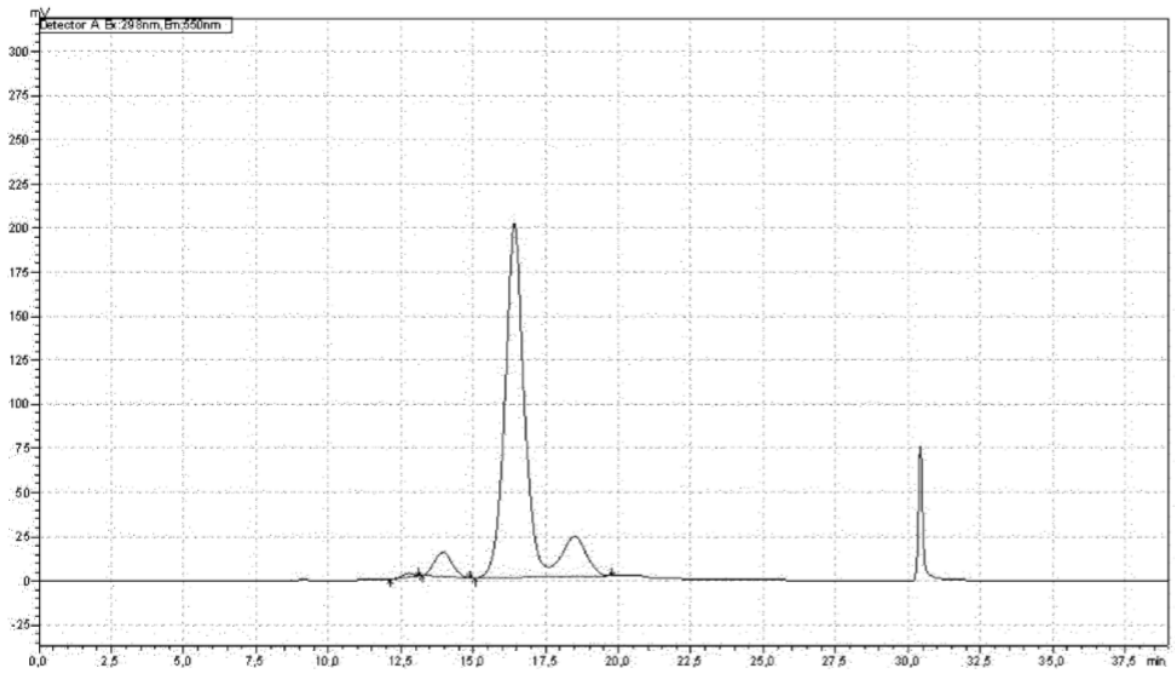


Fig. 3