

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 785 723**

51 Int. Cl.:

G01N 27/447 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2010 PCT/FR2010/000481**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.01.2011 WO11001045**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2010 E 10734185 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 2449370**

54 Título: **Análisis y dosificación de hemoglobinas glicosiladas por electroforesis capilar, composiciones tampón y kits para electroforesis capilar**

30 Prioridad:

01.07.2009 FR 0903220

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

07.10.2020

73 Titular/es:

**SEBIA (100.0%)
Parc Technologique Léonard de Vinci Rue
Léonard de Vinci
91090 Lisses, FR**

72 Inventor/es:

**DESCHAMPS, GÉRALD;
ROBERT, FRÉDÉRIC y
SIMONIN, DENIS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 785 723 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

Análisis y dosificación de hemoglobinas glicosiladas por electroforesis capilar, composiciones tampón y kits para electroforesis capilar

5 La presente solicitud se refiere al campo del análisis y de la dosificación de hemoglobinas glicosiladas, en particular, de la hemoglobina A_{1c}, por electroforesis capilar.

10 Se describen un método de análisis por electroforesis capilar de una muestra biológica que comprende una o varias hemoglobina(s) y, en particular, una o varias hemoglobina(s) glicosilada(s), así como unas composiciones tampón apropiadas para este análisis y unos estuches de análisis y de dosificación de hemoglobinas glicosiladas por electroforesis capilar. La invención trata, más particularmente, sobre un método de análisis por electroforesis capilar de una o varias hemoglobina(s) glicosilada(s) que incluye al menos una cadena de beta globina que incluye un residuo de glucosa unido al aminoácido que se encuentra en posición N-terminal, tal como se define en una de las reivindicaciones 1 a 11, sobre una composición tampón tal como se define en reivindicación 12 o 13, sobre un estuche tal como se define en reivindicación 14 y sobre la utilización de una composición tampón o de un estuche para la separación, por electroforesis capilar, de una o varias hemoglobina(s) glicosilada(s) que incluye al menos una cadena de beta globina que incluye un residuo de glucosa unido al aminoácido que se encuentra en posición N-terminal, de otras proteínas, tal como se define en reivindicación 15, en concreto, según la reivindicación 16, para el diagnóstico de la diabetes en un humano o un mamífero no humano y/o para el seguimiento del equilibrio glucémico de un mamífero humano o no humano.

25 La hemoglobina (Hb) es una molécula globular que comprende, generalmente, cuatro subunidades constituidas cada una por una cadena polipeptídica conjugada con una porción hem. Las cadenas polipeptídicas se designan colectivamente con el nombre de porción de globina de la molécula de hemoglobina.

30 Todas las hemoglobinas humanas están constituidas por cuatro cadenas polipeptídicas idénticas de dos en dos. En un humano adulto, normalmente, están presentes tres tipos de hemoglobina: la hemoglobina A (HbA), muy ampliamente mayoritaria (generalmente, representa alrededor de un 97 % de la hemoglobina en un adulto), constituida por 2 cadenas alfa y por dos cadenas beta (hemoglobina $\alpha_2\beta_2$), la hemoglobina A2 (HbA2; representa, generalmente, alrededor de un 1-3 % de la hemoglobina en un adulto) constituida por dos cadenas alfa y por dos cadenas delta (hemoglobina $\alpha_2\delta_2$) y la hemoglobina fetal (HbF), constituida por dos cadenas alfa y por dos cadenas gamma (hemoglobina $\alpha_2\gamma_2$), que no subsiste más que en el estado de trazas (generalmente, inferiores a un 1 % de la hemoglobina en un adulto) y permanece limitada a una población celular restringida (las "células F").

35 La hemoglobina contiene unas especies denominadas menores, que son unas hemoglobinas glicosiladas.

40 La hemoglobina glicosilada (llamada, igualmente, hemoglobina glucosilada o también glucohemoglobina) corresponde al conjunto de las moléculas de hemoglobina modificadas por fijación de osas, principalmente de glucosa, sobre las funciones amino (NH₂) de la globina; el grupo NH₂ de una hemoglobina se condensa con un grupo aldehído procedente de un azúcar reductor. Esta reacción, que es no enzimática, se estabiliza, a continuación, por un reordenamiento de Amadori. Los sitios de glicosilación potenciales son los aminoácidos N-terminales de las cuatro cadenas de globina de la hemoglobina (cadenas α y cadenas β , δ o γ según el tipo de hemoglobina) y los grupos amino-épsilon libres (en particular, los de los residuos de lisina) dentro de las cadenas de globina de la hemoglobina.

45 Existen unas numerosas formas de hemoglobina glicosilada en función del número de osas fijadas, de la naturaleza de las cadenas de globina y de las osas fijadas sobre estas cadenas y de la ubicación de estas osas sobre las cadenas de globina.

50 El término de hemoglobina glicosilada total se utiliza cuando se consideran las moléculas de hemoglobina glicosiladas sobre un residuo NH₂ cualquiera.

55 El término de hemoglobina A1 (HbA1) está reservado para las moléculas de hemoglobina A que tienen una molécula de osa unida al aminoácido N-terminal de una o de las dos cadenas beta de la proteína. La fracción A1, heterogénea, comprende, en concreto, las fracciones menores A_{1a}, A_{1b} y, sobre todo, A_{1c}. La hemoglobina A_{1a} (HbA_{1a}) agrupa la hemoglobina A_{1a1} (HbA_{1a1}), sobre la que la osa unida al aminoácido N-terminal es fructosa 1-6 difosfato y la hemoglobina A_{1a2} (HbA_{1a2}), sobre la que la osa unida al aminoácido N-terminal es glucosa-6-fosfato. En el caso de la hemoglobina A_{1b} (HbA_{1b}), la osa unida al aminoácido N-terminal es piruvato. Por último, la osa unida al aminoácido N-terminal de las cadenas beta de la hemoglobina A_{1c} (HbA_{1c}) es glucosa; la HbA_{1c} se obtiene por condensación de una molécula de glucosa con el grupo NH₂ de la valina N-terminal de la cadena β , para formar una cetamina estable, procedente de un reordenamiento (reordenamiento de Amadori) de una aldimina inestable previamente formada (denominada HbA_{1c} lábil o preA_{1c}).

65 Por último, generalmente, se agrupan bajo el término de hemoglobina A₀ (HbA₀) las hemoglobinas A no glicosiladas y las hemoglobinas A glicosiladas que no incluyen una osa unida sobre el aminoácido en posición N-terminal de las cadenas β .

La glicosilación de las proteínas (de las cuales la hemoglobina glicosilada y, en particular, la hemoglobina A_{1c} de entre muchas otras) está provocada por la concentración demasiado fuerte de azúcares en la sangre (como es este el caso en la diabetes). La glicosilación de las proteínas altera sus funciones, lo que provoca unas lesiones celulares, tisulares y un envejecimiento vascular y participa en el desarrollo de varias enfermedades, tales como la arteriosclerosis, la insuficiencia renal, la retinopatía diabética y la catarata. Una vez glicosilada, la hemoglobina transporta peor el oxígeno.

De entre todos los grupos y subgrupos de hemoglobina, la HbA_{1c} presenta un interés particular porque sirve como marcador a largo plazo del estado diabético de los pacientes. La formación de la HbA_{1c} depende de la glucemia (concentración de glucosa en la sangre). Interviene durante toda la vida útil de los glóbulos rojos, que, normalmente, es de 120 días. La concentración sanguínea de HbA_{1c} traduce, por lo tanto, un promedio de la glucemia sobre los 2-3 meses que anteceden a la dosificación. La elevación de la concentración sanguínea de HbA_{1c} es reveladora de una hiperglucemia prolongada en el transcurso de este período. En efecto, la concentración sanguínea de HbA_{1c} no está influenciada por unas breves fluctuaciones en las tasas de glucosa sanguínea. De este modo, midiendo la tasa de HbA_{1c} entre dos fechas, se puede seguir la evolución de una diabetes.

En el paciente diabético, la finalidad es obtener una tasa de HbA_{1c} lo más cerca posible de las cifras que caracterizan un buen equilibrio de la glucemia. El valor de referencia en un humano no diabético que tiene una glucemia normal es de un 4 a un 6 % de HbA_{1c} en la sangre con respecto a la concentración total de hemoglobinas A (hemoglobinas glicosiladas y hemoglobinas no glicosiladas) (esto es, 20 a 42 mmol/soles; Panteghini et al., 2007).

La detección de las hemoglobinas glicosiladas, en particular, la detección de un aumento de la tasa de HbA_{1c}, presente, por lo tanto, un interés manifiesto para el diagnóstico de la diabetes (de tipo 1 o de tipo 2) o el seguimiento de pacientes diabéticos y, en particular, para evaluar la eficacia de un tratamiento contra la diabetes (de tipo 1 o de tipo 2).

Con todo, la interpretación de los resultados es, a veces, delicada, ya que unos numerosos factores pueden falsear los resultados, en particular, la presencia de hemoglobinas anormales.

Unas hemoglobinas denominadas "anormales" o variantes, designadas, en concreto, por las letras S, C, D, E, H y J, se encuentran, en efecto, en ciertos pacientes. La hemoglobina A se reemplaza, entonces, parcial o totalmente por una o varias hemoglobinas anormales. Proviene, en concreto, de una síntesis reducida de ciertas cadenas de globina y/o de una modificación de estructura de las cadenas α , β , γ o δ , por sustitución de un aminoácido por otro. De este modo, una modificación que interviene al nivel de la cadena β puede dar lugar, por ejemplo, a unas hemoglobinas S o C (hemoglobinas $\alpha_2\beta_2$ en las que el ácido glutámico en posición 6 en la cadena β está sustituido respectivamente por una valina o una lisina).

Estas hemoglobinas anormales son, igualmente, susceptibles de estar glicosiladas. De este modo, existen, en concreto, las hemoglobinas S_{1c} (HbS_{1c}) y C_{1c} (HbC_{1c}) que, como la HbA_{1c}, incluyen una molécula de glucosa fijada sobre la valina N-terminal sobre unas cadenas β (Abraham et al., 1984).

Los métodos de análisis y de dosificación de la hemoglobina glicosilada y, en particular, de la hemoglobina HbA_{1c}, pueden clasificarse en 2 grandes categorías.

La primera categoría, mayoritaria, consta de unos métodos tales como los inmunoensayos o las cromatografías de afinidad. Está basada en las características estructurales de la molécula de azúcar unida a la hemoglobina. A título de ejemplo, la publicación de Wilson et al., 1993 y la patente US 6.162.645 describen un método de dosificación por cromatografía de afinidad de la hemoglobina glicosilada que se encuentra en una muestra de sangre humana. Dicho método descansa en la utilización de una fase sólida cargada positivamente acoplada, por medio de un compuesto polianiónico (por ejemplo, ácido poliacrílico), a ácido borónico, ácido fenilborónico, ácido bórico o un compuesto de boronato similar. Cuando una muestra de sangre a analizar se incuba con esta fase sólida, los residuos de glucosa de las moléculas de hemoglobina glicosilada presentes en esta muestra se complejan con el compuesto de boronato. Las moléculas de hemoglobina glicosilada se encuentran, de este modo, injertadas sobre la fase sólida. Entonces, se puede cuantificar la proporción de hemoglobina glicosilada inmovilizada sobre la fase sólida con respecto a la proporción de hemoglobina no inmovilizada. Esta dosificación se realiza ya sea midiendo la extinción de la fluorescencia (Wilson et al., 1993), ya sea utilizando unos anticuerpos marcados dirigidos contra la hemoglobina humana (US 6.162.645). Song S Y et al. en "Boronic acid-modified thin film interface for specific binding of glycosylated hemoglobin (HbA_{1c}) and electrochemical biosensing", Sensors and Actuators B, Elsevier Sequoia S.A., vol. 140, n.º 1, 2009, páginas 233-239 describe, igualmente, un método de detección de la fracción HbA_{1c}, precisamente, de las hemoglobinas, que emplea como agente de captura unos electrodos sobre los que se injertan unos ácidos borónicos mediante unos dendrímeros. Este documento discute, más particularmente, la manera según la que funcionalizar el electrodo, con el fin de permitir la biosensibilidad buscada.

La segunda categoría de métodos de análisis y de dosificación de la hemoglobina glicosilada consta de la cromatografía de intercambio iónico o la electroforesis. Explora las características físico-químicas de las moléculas y descansa en la diferencia de carga existente entre las proteínas glicosiladas y las proteínas no glicosiladas. De entre

los diferentes métodos analíticos que permiten una dosificación de la hemoglobina glicosilada descritos en la literatura, los métodos electroforéticos se dividen en varias categorías: los análisis sobre gel constan del análisis de enfoque isoelectrico sobre gel de poli(acrilamida) (Beccaria, 1978; Simon, 1982; Stickland, 1982; Bosisio, 1994) y el análisis sobre gel de agarosa (US 5.246.558; US 4.222.836; Menard, 1980). Los análisis de electroforesis capilar constan del análisis de enfoque isoelectrico (Molteni, 1994; Hempe, 1994), el análisis en solución libre que hace intervenir un anticuerpo anti-A_{1c} (US 5.431.793), el análisis en solución libre en capilar desnudo (US 5.599.433 y WO 96/22524) y el análisis en solución libre con recubrimiento ("coating") dinámico (EP 0 733 900 A2; US 5.611.903). También se conoce por el documento EP 1 659 398 un método de electroforesis capilar que emplea un tampón de análisis zwitteriónico asociado con un retardador de flujo para obtener una separación por electroforesis capilar entre las formas HbA₂, HbC, HbD, HbE, HbS, HbF y HbA de las hemoglobinas. El análisis por electroforesis de una muestra biológica permite separar las diferentes proteínas, en particular, las diferentes hemoglobinas, presentes en la muestra y determinar la cantidad y/o la proporción de una o varias proteína(s) de interés en la muestra biológica. En electroforesis capilar, en un capilar lleno de un electrolito, las proteínas de una muestra biológica migran bajo el efecto de un campo eléctrico del ánodo hacia el cátodo, en función de su masa y de su carga. Forman, de este modo, un perfil de migración electroforética que incluye una serie de picos (llamados, igualmente, fracciones), correspondiendo cada uno de entre ellos a una o varias proteínas. De este modo, unas hemoglobinas anormales tales como HbS, HbC y HbE presentan una movilidad electroforética diferente de la de HbA. Por lo demás, a causa del residuo oxa unido sobre el aminoácido N-terminal de las cadenas beta, la HbA₁ tiene un punto isoelectrico reducido y, por consiguiente, una carga eléctrica ligeramente diferente de la de las otras hemoglobinas de tipo HbA₀. De este modo, en un campo electroforético o en una resina de intercambio de iones, la HbA₁ presenta una velocidad de migración diferente de la de la HbA₀, lo que permite separar la HbA₁ de la HbA₀, que está cargada de manera diferente.

El interés de la electroforesis capilar radica, igualmente, en el hecho de que solo son necesarias unas cantidades muy pequeñas de muestra biológica a analizar. Por lo demás, la separación por esta técnica puede ser muy rápida, en la medida en que se pueden utilizar unos fuertes voltajes sin que la muestra se caliente demasiado durante la separación.

El análisis de enfoque isoelectrico (Molteni, 1994; Hempe, 1994) se realiza en capilares recubiertos. Para el recubrimiento ("coating"), se utiliza una solución de metilcelulosa. El catolito utilizado es el hidróxido de sodio (NaOH) y el anolito ácido fosfórico (H₃PO₄). Gracias a la utilización de anfolitos, este análisis permite separar las diferentes variantes de la hemoglobina, así como la HbA_{1c} cuyo pico es muy cerca del de la HbA ($\Delta pI < 0,10$). Aunque este método funciona bien, no es simple de implementar en rutina y necesita una gran precisión, en concreto, al nivel del rango de pH de los anfolitos (estando el punto isoelectrico (pI) de HbA_{1c} muy cerca del de HbA₀).

El análisis en solución libre que hace intervenir un anticuerpo anti-HbA_{1c} (US 5.431.793) se realiza en tampón de borato, a pH básico (pH 8 a 10), sobre unas muestras sometidas a una reacción con un anticuerpo monoclonal anti-HbA_{1c}. Más precisamente, se realiza un primer electroferograma sobre la muestra de trabajo sin reacción previa con un anticuerpo anti-HbA_{1c}. Se obtiene un solo pico, de área x, que contiene todas las hemoglobinas (de las cuales la HbA_{1c}). Se obtiene un segundo electroferograma por el análisis de la muestra de trabajo, previamente puesta en contacto con el anticuerpo anti-HbA_{1c}. De este modo, se separa el anticuerpo anti-HbA_{1c} no unido, el complejo de anticuerpo anti-HbA_{1c}/HbA_{1c} y las hemoglobinas no complejadas por el anticuerpo. La cantidad de HbA_{1c} se determina, entonces, por diferencia de área de picos, entre el pico del primer electroferograma y el del segundo relativo a las hemoglobinas no complejadas por el anticuerpo anti-HbA_{1c}, de área y, esto es, una cantidad x-y. Este método resulta, de este modo, largo y complicado de implementar.

El método de análisis en solución libre, en capilar desnudo (US 5.599.433 y WO 96/22524) hace intervenir un agente que compleja el azúcar unido a la hemoglobina (el borato) y un tampón zwitteriónico (el CAPS) a pH básico (pH 9 a 12). El perfil obtenido (presentado en la figura 1 de la presente solicitud) en las condiciones descritas muestra una separación bastante escasa de los picos de HbA₁ (descrito como que es el pico de HbA_{1c} en la patente US 5.599.433 y WO 96/22524) y HbA₀ (véase ejemplo 1). Por otro lado, el análisis de fracciones menores purificadas deja aparecer una comigración de las fracciones HbA_{1a,b} y HbA_{1c}, que interfiere en el resultado final de la dosificación (véase ejemplo 2 y figura 2 de la presente solicitud). De hecho, esta técnica separa las fracciones HbA₀ y HbA₁, pero no separa las fracciones HbA₁ entre sí.

La técnica de análisis en capilar con doble recubrimiento dinámico (EP 0 733 900 A2; US 5.611.903) se utiliza en la única prueba basada en la electroforesis capilar que se comercializa (kit Analisis CEofix™ HbA_{1c}). Consiste en un primer lavado del capilar por un "iniciador" que contiene un policatión (en solución a pH 4,6), que produce un recubrimiento de la pared del capilar por este policatión. A continuación, se realiza un segundo lavado con el tampón de análisis que contiene un polianión (pH 4,6), que tiene como efecto añadir una segunda capa de recubrimiento por interacción con el policatión. La cantidad de cargas eléctricas negativas presente, entonces, sobre la pared interna del capilar es todavía más elevada que sobre un capilar desnudo, de ahí un flujo electroosmótico todavía más importante. La resolución obtenida entre las diferentes formas de hemoglobina analizadas (de las cuales las hemoglobinas A1 glicosiladas) es satisfactoria, con unas duraciones de análisis cortas. De un punto de vista práctico, este doble recubrimiento debe rehacerse entre cada análisis según un proceso preciso proporcionado por el fabricante del kit, pero que no se ha descrito más que para un aparato monocapilar (P/ACE, Beckman), no adaptado para unos análisis de rutina.

Por lo tanto, subsiste una necesidad de unos reactivos y un método simple de implementar que permita separar eficazmente unas hemoglobinas glicosiladas, en particular, la HbA_{1c}, de las otras hemoglobinas, variantes, interferentes (formas lábiles, acetiladas, carbamiladas) y de las otras fracciones menores (en concreto, HbA_{1a} y HbA_{1b}) presentes en una muestra biológica que contiene otras hemoglobinas. Idealmente, un método de este tipo permitiría obtener una dosificación semicuantitativa o cuantitativa de hemoglobinas glicosiladas, en particular, de la HbA_{1c}, directamente a partir del perfil electroforético obtenido.

La presente invención propone un método de electroforesis capilar alternativo, tal como se define en la reivindicación 1, que permite realizar un análisis semicuantitativo o cuantitativo de una o varias hemoglobina(s) glicosilada(s) que incluye al menos una cadena de globina que incluye un residuo de glucosa unido al aminoácido que se encuentra en posición N-terminal, contenida(s) en una muestra biológica que incluye, en concreto, otras hemoglobinas (glicosiladas y/o no glicosiladas). Dicho método de la invención explota a la vez las características estructurales de las moléculas de glucosa unidas a estas hemoglobinas glicosiladas y las diferencias de carga que existen entre las diferentes hemoglobinas de la muestra.

Los inventores han mostrado que utilizando una composición tampón particular, es posible obtener una separación ampliamente mejorada de las hemoglobina(s) glicosilada(s) que incluye un residuo de glucosa unido al aminoácido que se encuentra en posición N-terminal sobre al menos una cadena de globina y según la invención sobre las cadenas beta y, más particularmente, una separación ampliamente mejorada de la HbA_{1c}.

Una de las ventajas del método de la invención es permitir, por el hecho de la utilización de dicha composición tampón, un desplazamiento del pico de electroforesis correspondiente a uno o varios tipos de hemoglobina(s) glicosilada(s) de interés (uno o varios tipos de hemoglobina(s) que incluye un residuo de glucosa unido al aminoácido que se encuentra en posición N-terminal sobre al menos una cadena de globina, por ejemplo, la HbA_{1c}) cuando está presente en una muestra biológica con respecto a la posición del pico que se obtendría sin la composición tampón. Este desplazamiento no interfiere con la separación de las otras proteínas, en particular, de las otras hemoglobinas (glicosiladas y/o no glicosiladas) de la muestra. Esto permite, en concreto, separar la HbA_{1c} de otras HbA₁ menores (en concreto, HbA_{1a} y HbA_{1b}). En consecuencia, este método permite una lectura fiable de los resultados del análisis y una dosificación precisa de una o varias hemoglobina(s) glicosilada(s) de interés que incluye uno o varios residuo(s) de glucosa con un residuo de glucosa unido al aminoácido que se encuentra en posición N-terminal sobre al menos una cadena de globina (por ejemplo, la hemoglobina A_{1c}).

Por lo tanto, el método de la invención constituye un método de elección con vistas al establecimiento de un diagnóstico o al seguimiento de pacientes diabéticos, en concreto, para evaluar la eficacia de un tratamiento antidiabético.

De este modo, la presente solicitud describe un método de análisis, por electroforesis capilar, de hemoglobinas glicosiladas (una o varias hemoglobina(s) glicosilada(s)) que incluye uno o varios residuo(s) de glucosa, contenidas en una muestra biológica que comprende una o varias hemoglobina(s), comprendiendo dicho método la implementación de una composición tampón que comprende al menos un compuesto capaz, por una parte, de complejar específicamente unos residuos de glucosa (uno o varios residuo(s)) de hemoglobinas glicosiladas (una o varias hemoglobina(s) glicosilada(s)) de la muestra biológica y, por otra parte, de aportar a estas hemoglobinas glicosiladas varias carga(s) eléctrica(s) negativa(s) a pH alcalino (es decir, a un pH superior a 7).

Por "varios", se entiende, en el sentido de la presente solicitud, al menos dos, es decir, dos o más de dos, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez.

Por "al menos un(a)", se entiende, en el sentido de la presente solicitud, un(a) o varios(as).

El término "hemoglobina", engloba, en el sentido de la presente solicitud, cualquier forma o fracción de hemoglobina (comprendidas las fracciones menores), ya sea normal o anormal, así como las numerosas variantes de estas hemoglobinas (existen al menos 1.000 variantes descritas de la hemoglobina).

Por "hemoglobina glicosilada", se entiende, en la presente solicitud, cualquier hemoglobina modificada por la fijación de uno o varios azúcar(es), en particular, de una o varias glucosa, glucosa-6-fosfato, fructosa 1-6 difosfato o piruvato, sobre una o varias cadena(s) de globina (sea(n) la(s) que sea(n) la o las cadena(s) de globina). El(los) azúcar(es) puede(n) estar fijados sobre un aminoácido que se encuentra en posición N-terminal sobre una cadena de globina y/o sobre un aminoácido que tiene un grupo amino libre (la lisina, por ejemplo).

La expresión "cadena de globina" designa, en la presente solicitud, cualquier cadena de globina conocida por el experto en la materia, en particular, una cadena elegida de entre las cadenas alfa (α), beta (β), delta (δ) y gamma (γ), ya sean normales o anormales o también una variante de una de estas cadenas. Según la invención, dicha "cadena de globina" es una cadena beta, por ejemplo, una cadena beta de una hemoglobina A₁, en particular, A_{1c}, S o C.

Cuando se hace referencia a la hemoglobina glicosilada, hay que entender que esta mención se aplica, en particular, a cada tipo particular de hemoglobina glicosilada citado en la presente solicitud.

Salvo indicación contraria, cada modo de realización indicado en esta solicitud se aplica independientemente y/o en combinación con uno cualquiera o varios de los otros modos de realización descritos.

5 El método de análisis por electroforesis capilar de la invención se aplica a una muestra biológica que comprende al menos una hemoglobina glicosilada que incluye uno o varios residuo(s) de glucosa y que incluye necesariamente, sobre una o varias cadena(s) de beta globina, un residuo de glucosa unido al aminoácido que se encuentra en posición N-terminal. Estas hemoglobinas también se denominan "hemoglobinas glicosiladas en posición N-terminal" en la presente solicitud.

10 Dicho método permite separar una o varias hemoglobina(s) glicosilada(s) en posición N-terminal de las otras hemoglobinas glicosiladas (es decir, de las hemoglobinas glicosiladas cuyas cadenas de globina están desprovistas de residuo de glucosa unido al aminoácido que se encuentra en posición N-terminal) o de las hemoglobinas no glicosiladas, que están presentes eventualmente en la muestra biológica analizada.

15 Según un modo de realización particular, el aminoácido que se encuentra en posición N-terminal sobre las cadena(s) beta es la valina.

20 El método de análisis de la invención está, en un modo de realización preferente, destinado a analizar una muestra biológica que comprende hemoglobina A_{1c}. Es, en particular, apropiado para separar la hemoglobina A_{1c} de otras o de las otras hemoglobinas (glicosiladas de manera diferente o no glicosiladas) eventualmente presentes en la muestra biológica analizada y, en particular, de otras fracciones menores, por ejemplo, de la HbA_{1a} y de la HbA_{1b}.

25 Según un modo de realización particular, el método de análisis de la invención permite separar la hemoglobina S_{1c} y/o la hemoglobina C_{1c}, de las otras hemoglobinas (glicosiladas de manera diferente o no glicosiladas) eventualmente presentes en la muestra biológica analizada.

Por "composición tampón", se entiende una composición, en particular, una solución, que conserva aproximadamente el mismo pH a pesar de la adición de pequeñas cantidades de un ácido o de una base o a pesar de una dilución.

30 El término "complejar" o "complejación" se utiliza en la presente solicitud para significar que tiene lugar una asociación (química o simplemente física) entre dos entidades, en particular, entre dos moléculas (por ejemplo, una molécula pequeña y una macromolécula) mediante unos grupos funcionales.

35 En un modo de realización preferente, una de estas dos entidades (el compuesto capaz de complejar unos residuos de glucosa) se asocia con (por ejemplo, reacciona con) un grupo cis-diol, en particular, con dos grupos hidroxilo vecinales, de un residuo de glucosa de la otra entidad (una hemoglobina glicosilada).

40 Como se muestra en la parte "ejemplos", "complejar específicamente el(los) residuo(s) de glucosa de una o varias hemoglobina(s) glicosilada(s) y aportarles unas cargas negativas a pH alcalino" significa, en la presente solicitud, que el compuesto utilizado en una composición tampón en el marco de un método según la invención permite desplazar el pico de migración electroforética correspondiente a una hemoglobina glicosilada en posición N-terminal por glucosa, fuera de la zona de migración electroforética correspondiente a unas hemoglobinas glicosiladas en posición N-terminal por otro azúcar (por ejemplo, glucosa-6-fosfato, fructosa 1-6 difosfato o piruvato) y preferentemente fuera de la zona de los picos de migración electroforética que corresponden a las otras hemoglobinas de la muestra. De este modo, las fracciones menores que no incluyen un residuo de glucosa unido al aminoácido N-terminal de las cadenas beta, en particular, las fracciones A_{1a} y A_{1b}, no interfieren con el análisis de la HbA_{1c} según el método según la invención.

45 A título de ejemplo, la capacidad de un compuesto para complejar específicamente unos residuos de glucosa de una o varias hemoglobina(s) glicosilada(s) y para aportar unas cargas negativas a pH alcalino en el sentido de la invención se puede poner de manifiesto por la siguiente prueba: una muestra de referencia (por ejemplo, "HbA_{1a}, HbA_{1b} mezcla", "A_{1c}" y "A₀" de Exocell, EE.UU.), que contiene diferentes fracciones de hemoglobina glicosilada purificadas y, en particular, las fracciones A₀ y A_{1c} o las fracciones A₀, A_{1b} y A_{1a}, se introduce en un capilar de electroforesis capilar que contiene la siguiente composición tampón: 200 mM de CHES, 20 mM de putrescina, entre 10 y 120 mM (por ejemplo, 30 mM o 50 mM) de compuesto a probar, llegado el caso, 2,5 g/l de cloruro de sodio, agua y, llegado el caso, una base para ajustar el pH a un valor superior a 9, por ejemplo, a 9,4. Entonces, se realiza una electroforesis capilar en solución libre en capilar desnudo, por ejemplo, en un aparato Capillarys® (Sebia), a una longitud de onda de 415 nm. A continuación, se estudia el perfil electroforético obtenido; si la separación es perfecta entre el pico correspondiente a HbA_{1c} y el pico correspondiente a HbA₀ (o, en función del tipo de muestra utilizado, entre el pico correspondiente a HbA_{1c} y los picos que corresponden a HbA₀, HbA_{1b} y HbA_{1a}), entonces, el compuesto probado se considera como que es capaz de complejar específicamente unos residuos de glucosa y de aportar unas cargas negativas a pH alcalino en el sentido de la invención. Al contrario, si el pico correspondiente a HbA_{1c} y el que corresponde a HbA_{1b} (o, en función del tipo de muestra utilizado, el pico correspondiente a HbA_{1c} o el que corresponde a HbA₀, HbA_{1b} o HbA_{1a}) se superponen o se solapan, entonces, el compuesto probado no se considera como que es apropiado para implementar la invención.

65 La concentración del compuesto a probar no se da más que a título indicativo en la prueba indicada más arriba; si una

concentración de 10 a 120 mM de compuesto a probar no permite obtener una separación suficiente entre el pico correspondiente a HbA_{1c} y el pico correspondiente a las otras hemoglobinas de la muestra en el marco de la prueba indicada más arriba, es posible salir de este rango de concentración, con el fin de obtener una separación óptima del pico correspondiente a HbA_{1c}.

5 Cualquier compuesto químico (es decir, generalmente, una molécula orgánica), cualquier anticuerpo, polipéptido, péptido o cualquier otro compuesto capaz de complejar específicamente unos residuos de glucosa y de aportar unas cargas negativas a pH alcalino en el sentido de la presente descripción puede, de este modo, utilizarse. Un anticuerpo apropiado se puede generar por cualquier método conocido por el experto en la materia y puede ser, por ejemplo, un anticuerpo policlonal o monoclonal, un anticuerpo quimérico o un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fab. Según la invención, un compuesto presenta las características definidas en la reivindicación 1.

15 Como se ilustra en la parte "ejemplos", el ácido bórico no es un compuesto químico capaz de complejar específicamente unos residuos de glucosa y de aportar unas cargas negativas a pH alcalino en el sentido de la presente invención, ya que no permite realizar un análisis fiable y, en particular, una dosificación fiable de hemoglobinas glicosiladas y, en concreto, de la HbA_{1c}. Unos ejemplos de compuestos químicos apropiados se definen más precisamente a continuación.

20 Cada residuo de glucosa complejoado con el compuesto capaz de complejar específicamente unos residuos de glucosa interactúa con una molécula de compuesto diferente.

25 Según un modo de realización particular, cuando está presente en cantidad suficiente en una composición tampón empleada en un método según la invención, dicho compuesto es capaz de complejar específicamente el(los) residuo(s) de glucosa N-terminales de una hemoglobina glicosilada, es decir, de complejar específicamente, para cada cadena de beta globina que incluye un residuo de glucosa unido al aminoácido que se encuentra en posición N-terminal, dicho residuo de glucosa. Dicho compuesto es, de este modo, capaz de complejar específicamente cada residuo de glucosa que se encuentra unido a la valina en posición N-terminal sobre las cadenas beta de una hemoglobina A_{1c} o también de una hemoglobina S_{1c} o C_{1c}.

30 Según un modo de realización particular, dicho compuesto es capaz, cuando está presente en cantidad suficiente en una composición tampón empleada en un método según la invención, de complejar específicamente todos los residuos de glucosa de las hemoglobinas glicosiladas en posición N-terminal por una glucosa.

35 Según un modo de realización particular, dicho compuesto es capaz, cuando está presente en cantidad suficiente en una composición tampón empleada en un método según la invención, de complejar específicamente todos los residuos de glucosa de una hemoglobina, sea la que sea su posición sobre la o las cadena(s) de globina. De este modo, cuando dicho compuesto está presente en cantidad suficiente en una composición tampón empleada en un método según la invención, una molécula de hemoglobina que incluye un número x de residuos de glucosa puede fijar un número x de moléculas de dicho compuesto.

40 Complejándose específicamente con uno o varios residuo(s) de glucosa de hemoglobinas glicosiladas de una muestra biológica, dicho compuesto aporta a esta o estas hemoglobina(s) glicosilada(s) varias cargas eléctricas negativas a pH alcalino, es decir, permite sobrecargar esta(s) hemoglobina(s) glicosilada(s) de cargas eléctricas negativas a pH alcalino.

45 Dicho compuesto aporta varias cargas eléctricas negativas a pH alcalino a cada residuo de glucosa complejoado, de este modo, de una misma hemoglobina. Debido a este aporte de cargas eléctricas negativas a pH alcalino, las hemoglobinas que incluyen al menos un residuo de glucosa ven su movilidad electroforética modificarse bajo el efecto de su complejación con dicho compuesto. Esto se manifiesta, sobre un perfil electroforético, por el desplazamiento del o de los picos de electroforesis que corresponden a las hemoglobinas glicosiladas que incluyen uno o varios residuo(s) de glucosa que están presentes en la muestra biológica analizada.

50 Todas las hemoglobinas que incluyen al menos un residuo de glucosa que están presentes en la muestra biológica forman un complejo con el compuesto que compleja la glucosa y que aporta unas cargas eléctricas negativas a pH alcalino (con la condición, por supuesto, de que dicho compuesto esté presente en cantidad suficiente para complejar cada una de estas hemoglobinas). Sin embargo, las diferentes hemoglobinas y, en particular, las diferentes hemoglobinas que incluyen al menos un residuo de glucosa tienen todas en origen un punto isoeléctrico diferente (a causa de la naturaleza de sus cadenas de globina, el número y la posición del o de los residuo(s) de glucosa sobre estas cadenas de globinas y el número, la naturaleza y la posición de los otros azúcares eventualmente unidos sobre estas hemoglobinas). Teniendo en cuenta las cargas eléctricas negativas a pH alcalino aportadas por la complejación de cada residuo de glucosa con dicho compuesto, la diferencia de carga entre estas diferentes hemoglobinas es todavía más marcada cuando están en forma complejada con dicho compuesto.

65 Las hemoglobinas glicosiladas que incluyen un residuo de glucosa unido sobre el aminoácido que se encuentra en posición N-terminal sobre al menos una de sus cadenas de beta globina poseen, por este hecho, al menos una glucosa más que las otras hemoglobinas (glicosiladas de manera diferente o no glicosiladas). En particular, la hemoglobina

A_{1c} posee sobre las cadenas beta al menos una glucosa más que las otras fracciones menores de la hemoglobina A₁. Por consiguiente, cuando se complejan en el marco de un método según la invención, estas hemoglobinas glicosiladas en posición N-terminal están más fuertemente cargadas con cargas eléctricas negativas a pH alcalino por dicho compuesto que las otras hemoglobinas (las hemoglobinas glicosiladas que no incluyen un residuo de glucosa unido sobre el aminoácido N-terminal de las cadenas de globina o las hemoglobinas no glicosiladas).

Aumentando, de este modo, la diferencia de movilidad electroforética que existe entre las diferentes hemoglobinas que incluyen glucosa y/o entre una o varias hemoglobina(s) que incluyen glucosa y las otras hemoglobinas presentes en la muestra biológica analizada, se obtiene una mejor separación entre una o varias hemoglobina(s) glicosilada(s) en posición N-terminal y la o las otra(s) hemoglobina(s) eventualmente presente(s) en dicha muestra, en particular, entre la hemoglobina A_{1c} y las otras fracciones menores de la hemoglobina A₁ eventualmente presente(s) en dicha muestra.

De este modo, el método de la invención permite separar eficazmente unas hemoglobinas glicosiladas en posición N-terminal y, en particular, la HbA_{1c}, de las otras hemoglobinas, de ciertas variantes y de las otras fracciones menores presentes en una muestra biológica que contiene otras hemoglobinas. Además, unos interferentes clásicos tales como las formas lábiles, acetiladas o carbamiladas no interfieren con la dosificación de la HbA_{1c} según el método de la invención. El método de la invención permite, en particular, evitar las interferencias que podrían resultar, en ausencia de cargas eléctricas negativas a pH alcalino añadidas por la complejación, de la comigración de la hemoglobina A_{1c} y de las otras fracciones menores de la hemoglobina A₁ (de las cuales la HbA_{1a} y la HbA_{1b}) presentes en la muestra biológica, durante la etapa de separación electroforética.

La o las hemoglobina(s) glicosilada(s) en posición N-terminal separada(s), de este modo, se puede(n) dosificar, a continuación, y esto, en presencia de otras o de las otras hemoglobinas eventualmente presentes en la muestra biológica analizada. Por lo tanto, se puede dosificar, por ejemplo, la HbA_{1c} en presencia de otras fracciones menores de la hemoglobina A₁ y, en particular, en presencia de HbA_{1a} y/o HbA_{1b}, sin que estas otras fracciones menores presentes en la muestra biológica analizada interfieran con esta dosificación.

El término "dosificar" o "dosificación" significa, en la presente solicitud, que se determina la cantidad de la hemoglobina o de las hemoglobinas de interés en presencia eventualmente de una o varias otra(s) hemoglobina(s) de la muestra biológica analizada y/o la proporción de dicha o de dichas hemoglobina(s) de interés con respecto a la cantidad total de hemoglobina o con respecto a la cantidad de ciertas hemoglobinas presentes en dicha muestra.

La dosificación realizada en el marco de la invención puede ser semicuantitativa; se mide, entonces, el porcentaje de una hemoglobina dada con respecto a la cantidad de otra hemoglobina o de otras hemoglobina(s) presente(s) en dicha muestra. De este modo, en el caso de la HbA_{1c}, se mide, entonces, generalmente, el porcentaje de HbA_{1c} con respecto a la cantidad de una o varias otra(s) hemoglobina(s) A; se divide, en general, el área del pico electroforético correspondiente a HbA_{1c} por el área del pico correspondiente a HbA₀ o bien por la suma (área del pico correspondiente a HbA_{1c} + área del pico correspondiente a HbA₀), por la suma (área de todos los picos de HbA) o bien por la suma (área del pico correspondiente a HbA_{1c} + área del pico correspondiente a HbA₀ + área del pico correspondiente a HbA₂) o también por la superficie total del perfil electroforético.

Igualmente, puede tratarse de una dosificación cuantitativa; los resultados se expresan, entonces, en milimoles (mmoles) de una hemoglobina dada por mol de otra hemoglobina o de otras hemoglobina(s) presente(s) en dicha muestra, por ejemplo, en mmoles de HbA_{1c} por mol de HbA.

En el marco del método según la invención, el compuesto que compleja específicamente unos residuos de glucosa de hemoglobinas glicosiladas y que aporta a estas hemoglobinas glicosiladas unas cargas negativas a pH alcalino comprende dos o más de dos grupos funcionales.

Uno al menos de estos grupos funcionales compleja específicamente un residuo de glucosa unido al aminoácido que se encuentra en posición N-terminal sobre una cadena de globina interactuando, por ejemplo, con un grupo cis-diol, en particular, con dos grupos hidroxilo vecinales, de un residuo de glucosa. A título de ejemplo, este(estos) grupo(s) puede(n) ser un grupo de boronato, en particular, un grupo de boronato tal como se define en la presente solicitud.

Este(estos) grupo(s) que compleja la glucosa, puede(n) aportar una carga eléctrica negativa a pH alcalino por residuo de glucosa complejoado, esto es, una o varias carga(s) negativa(s) a pH alcalino por molécula de hemoglobina complejada (una carga negativa si la molécula de hemoglobina no incluye más que un residuo de glucosa y n cargas negativas si la molécula de hemoglobina incluye n residuos de glucosa).

El otro, uno de los otros o los otros grupo(s) funcional(es) de dicho compuesto (es decir, el(los) grupo(s) funcional(es) que no compleja(n) la glucosa) aportan, por su parte, una o varias carga(s) eléctrica(s) negativa(s) a pH alcalino para cada residuo de glucosa complejoado de una molécula de dicha hemoglobina.

De este modo, en el marco del método según la invención, cada molécula de compuesto que compleja específicamente unos residuos de glucosa incluye al menos un grupo funcional capaz de complejar un residuo de glucosa N-terminal

de una hemoglobina glicosilada en posición N-terminal y al menos un grupo funcional que no compleja la glucosa, pero permite sobrecargar esta hemoglobina glicosilada con cargas negativas a pH alcalino, ya que aporta una o varias carga(s) negativa(s) suplementarias a pH alcalino a esta hemoglobina glicosilada. El grupo funcional capaz de complejar la glucosa puede aportar, igualmente, una carga eléctrica negativa a pH alcalino.

5 En el marco del método según la invención, el compuesto que compleja específicamente unos residuos de glucosa y que aporta unas cargas negativas a pH alcalino (más precisamente, cada molécula de este compuesto) aporta, para cada residuo de glucosa complejoado, varias cargas eléctricas negativas a pH alcalino a una molécula de hemoglobina glicosilada en posición N-terminal. Preferentemente, aporta para cada residuo de glucosa complejoado, al menos dos
10 (en particular, dos, tres, cuatro, cinco o seis) cargas eléctricas negativas a pH alcalino a una molécula de hemoglobina glicosilada.

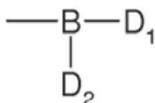
Según un modo de realización particular de la invención, el grupo funcional o al menos uno de los grupos funcionales que compleja específicamente unos residuos de glucosa está cargado negativamente a pH alcalino.

15 Según un modo de realización particular de la invención, el compuesto capaz de complejar específicamente unos residuos de glucosa de hemoglobinas glicosiladas y de aportarles unas cargas negativas a pH alcalino incluye uno o varios grupos ionizables (en particular, anionizables) a pH alcalino. Estos grupos ionizables pueden ser de diferentes tipos. Por ejemplo, el compuesto puede incluir uno o varios carboxilato(s), carboxilo(s), sulfonato(s) y/o sulfonilo(s).
20 Dicho compuesto puede ser, en concreto, un ácido policarboxílico, en particular, un ácido dicarboxílico o tricarboxílico. Dicho compuesto puede ser, igualmente, un ácido polisulfónico, en particular, un ácido disulfónico o trisulfónico.

Según un modo de realización particular de la invención, el grupo, uno de los grupos o los grupos que aportan una o varias carga(s) eléctrica(s) negativa(s) a pH alcalino para cada residuo de glucosa complejoado de una molécula de hemoglobina glicosilada comprende(n) o consiste(n) en uno o varios grupo(s) ionizable(s) a pH alcalino tales como se definen en la presente solicitud y, en particular, uno o varios (en concreto, dos o tres) grupo(s) carboxilato, carboxilo, sulfonato y/o sulfonilo.

Según un modo de realización particular de la invención, el grupo, uno de los grupos o los grupos que compleja específicamente unos residuos de glucosa comprende(n) o consiste(n) en uno o varios grupo(s) de boronato.

Por "grupo de boronato", se entiende, en la presente solicitud, un grupo de fórmula:



35 en el que D₁ y D₂ se eligen, independientemente uno del otro, de entre un grupo hidroxilo y un grupo susceptible de hidrolizarse para dar un grupo hidroxilo en solución acuosa, en particular, a un pH alcalino.

40 En un modo de realización particular de la invención, dicho grupo de boronato es el grupo -B(OH)₂, (igualmente llamado grupo boronilo) o una forma ionizada, en particular, -B(OH)₃⁻.

En un modo de realización particular de la invención, el compuesto capaz de complejar específicamente unos residuos de glucosa de hemoglobinas glicosiladas y de aportarles unas cargas negativas a pH alcalino es

- 45 (i) un compuesto de boronato, de fórmula general RB(OH)₂ (compuesto llamado, igualmente, ácido borónico) o de fórmula general RB(OH)₃, cuyo grupo R comprende al menos un arilo y/o un alquilo (lineal, ramificado o cíclico) y/o un aralquilo y/o una combinación de estos y dicho grupo R aporta una o varias carga(s) eléctrica(s) negativa(s) a pH alcalino para cada residuo de glucosa complejoado con el grupo de boronato; o
50 (ii) una sal de este compuesto de boronato.

De este modo, a pH alcalino, además de la carga eléctrica negativa a pH alcalino aportada por el grupo boronilo o de boronato del compuesto de boronato o de su sal, el grupo R aporta una o varias carga(s) eléctrica(s) negativa(s) suplementarias para cada residuo de glucosa complejoado con el grupo boronilo o de boronato.

55 Por "compuesto de fórmula general RB(OH)₂", se entiende, igualmente, en el sentido de la presente solicitud, cualquier forma iónica en equilibrio con esta, en concreto, RB(OH)₃⁻ o cualquier forma susceptible de estar en equilibrio con esta en función de las condiciones del medio.

60 Una "sal" en el sentido de la presente solicitud designa cualquier sal y, en particular, una sal de sodio, de litio o de potasio.

El grupo R del compuesto de boronato puede constar, igualmente, de otras funciones y/o heteroátomos, además de

la o las funciones arilo, alquilo, aralquilo o una de sus combinaciones.

5 Según un modo de realización particular, el grupo R aporta dos o más de dos (preferentemente dos) cargas eléctricas negativas a pH alcalino para cada residuo de glucosa complejado con el grupo boronilo o de boronato del compuesto de boronato de la invención o de su sal.

Según un modo de realización particular, el grupo R consiste en uno o varios arilo(s), alquilo(s) (lineal(es), ramificado(s) o cíclico(s)) y/o aralquilo(s) y/o una combinación de estos.

10 Según un modo de realización particular, el o los arilo(s), alquilo(s), aralquilo(s) o los otros grupos funcionales y/o heteroátomos o sus combinaciones presente(s) en el grupo R del compuesto de boronato puede(n) estar sustituido(s).

15 El término "sustituido" tal como se utiliza en la presente solicitud puede significar monosustituido o, al contrario, polisustituido, en concreto, di-, tri-, tetra-, penta- o hexasustituido.

Los sustituyentes pueden ser, en concreto, unos grupos ionizables (en particular, anionizables) a pH alcalino tales como se definen en la presente solicitud. El grupo R puede constar, igualmente, de uno o unos heteroátomos o de otros grupos funcionales.

20 Según un modo de realización particular de la invención, el grupo R del compuesto de boronato aporta, para cada residuo de glucosa complejado, una o varias carga(s) eléctrica(s) negativas a pH alcalino a una molécula de hemoglobina glicosilada. Preferentemente, aporta para cada residuo de glucosa complejado, una, dos, tres o cuatro cargas eléctricas negativas a pH alcalino a una molécula de hemoglobina glicosilada.

25 Un compuesto de boronato tal como se ha definido más arriba consta, en concreto, de unos ácidos borónicos y, en particular, de unos ácidos fenilborónicos.

30 Según un modo de realización particular de la invención, el compuesto capaz de complejar específicamente unos residuos de glucosa de hemoglobinas glicosiladas y de aportarles unas cargas negativas a pH alcalino es un fenilboronato polisustituido, en particular, un fenilboronato disustituido, por ejemplo, por unos grupos carboxilo(s) y/o sulfonilo(s).

35 Según un modo de realización particular de la invención, el grupo R del compuesto de boronato o de su sal es un diácido, en particular, un ácido dicarboxílico. Según un modo de realización particular de la invención, el compuesto de boronato es un ácido diCarboxiFenilBorónico, preferentemente elegido de entre el ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico y el ácido 3,4-diCarboxiFenilBorónico.

40 De este modo, a título de ejemplo, se puede utilizar, a título de compuesto de boronato, el ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico (3,5-dCPBA). Este compuesto está disponible comercialmente, en concreto, por parte de la compañía Combiblocks Inc. (San Diego, EE.UU.), bajo el nombre comercial 3,5-dicarboxyphenylboronic acid y por parte de la compañía Apollo Scientific Ltd (Cheshire, Reino Unido), bajo el nombre comercial 3,5-dicarboxybenzeneboronic acid.

45 En la composición tampón utilizada en el marco de un método según la invención, la concentración del compuesto capaz de complejar específicamente unos residuos de glucosa de hemoglobinas glicosiladas y de aportarles unas cargas negativas a pH alcalino está, generalmente, en exceso estequiométrico con respecto a la cantidad total de proteínas, en particular, con respecto a la cantidad total de todas las hemoglobinas presentes en la muestra biológica o con respecto a la cantidad total de todas las hemoglobinas que incluyen glucosa presentes en la muestra biológica.
50 De este modo, la cantidad de este compuesto en la composición tampón es superior a la cantidad necesaria para que todos los residuos de glucosa de las hemoglobinas presentes en la muestra se complejen por dicho compuesto cuando se diluye la muestra o una parte alícuota de esta muestra en la composición tampón. De este modo, para cada molécula de hemoglobina glicosilada que incluye glucosa presente en la muestra biológica analizada, hay al menos tantas moléculas de este compuesto en la composición tampón como residuos de glucosa presentes en esta molécula de hemoglobina glicosilada. Esto permite obtener una separación completa de la hemoglobina glicosilada o de las
55 hemoglobinas glicosiladas de interés de las otras hemoglobinas presentes, igualmente, en la muestra biológica analizada.

60 Según un modo de realización particular de la invención, la concentración, en la composición tampón, del compuesto capaz de complejar específicamente unos residuos de glucosa de hemoglobinas glicosiladas y de aportarles unas cargas negativas a pH alcalino está comprendida entre 0,10 y 100 mM, preferentemente entre 10 y 60 mM y más preferentemente entre 20 y 50 mM, por ejemplo, 30 mM o 50 mM.

65 La expresión "comprendido(a) entre x e y" significa, en la presente solicitud que el rango de valor x-y indicado consta ahí de los extremos x e y.

Según un modo de realización particular, la composición tampón comprende, además:

- un compuesto tampón que tiene pKa comprendido entre 8,0 y 11,0; y/o
- un retardador de flujo; y/o
- una base; y/o
- 5 - una sal; y/o
- una solución de dilución apropiada, por ejemplo, agua.

De este modo, la composición tampón puede comprender o consistir en (i) un compuesto capaz de complejar específicamente unos residuos de glucosa de hemoglobinas glicosiladas y de aportarles unas cargas negativas a pH alcalino y (ii) uno o varios y, en particular, el conjunto de los compuestos elegidos de entre: un compuesto tampón que tiene un pKa comprendido entre 8,0 y 11,0, un retardador de flujo, una base, una sal (en particular, una sal de sodio, por ejemplo, cloruro de sodio), una solución de dilución apropiada (por ejemplo, agua) y sus mezclas.

El compuesto tampón es preferentemente un compuesto zwitteriónico. En concreto, se puede elegir de entre el AMP, el AMPD, el AMPSO, la bicina, el CABS, el CAPS, el CAPSO, el CHES, el HEPBS, la metilamina, el TABS, el TAPS, la taurina, la tricina y el Tris; en particular, se elige el CAPS, el CAPSO o el CHES, preferentemente el CHES. Estos compuestos tienen un fuerte poder tampón a los pH dianas (pH 8-11) y están particularmente adaptados para obtener un buen enfoque de las hemoglobinas.

La concentración del compuesto tampón en la composición tampón está, generalmente, comprendida entre 20 y 500 mM, preferentemente entre 50 y 400 mM y más preferentemente entre 100 y 350 mM o entre 150 y 300 mM, por ejemplo, alrededor de 200 mM o alrededor de 300 mM.

El retardador de flujo está destinado a reforzar el efecto de las diferencias de carga eléctrica, con el fin de obtener una buena resolución de separación entre las diferentes hemoglobinas. Este tipo de compuesto actúa disminuyendo el flujo electroosmótico, lo que retrasa la migración de las diferentes fracciones y permite aumentar su separación. El retardador de flujo utilizado puede ser una diamina alifática, en particular, una diamina alifática elegida de entre los 1,3-diaminopropano, 1,4-diaminobutano (putrescina), 1,5-diaminopentano (cadaverina), 1-6-diaminohexano, la espermina y la DETA o también un derivado de esta diamina alifática o una de sus mezclas.

Por "derivado", se entiende, en el presente documento, en concreto, una poliamina alifática, una poliamina cíclica, una sal (por ejemplo, una sal de sodio) o una de sus mezclas.

Según un modo de realización particular de la invención, el retardador de flujo se elige de entre la putrescina, sus derivados y sus mezclas.

Según un modo de realización particular de la invención, el retardador de flujo es putrescina. En particular, la putrescina está en forma pura, con, llegado el caso, agregación de una sal (en particular, una sal de sodio, por ejemplo, cloruro de sodio).

Según otro modo de realización particular de la invención, el retardador de flujo es clorhidrato de putrescina (o putrescina 2HCl).

En la composición tampón de la invención, la concentración del retardador de flujo está comprendida ventajosamente entre 0,10 y 40 mM, preferentemente entre 10 y 30 mM y más preferentemente entre 15 y 25 mM, por ejemplo, 20 mM.

La base eventualmente añadida en la composición tampón permite ajustar el pH de dicha composición. En concreto, se puede utilizar una base que pertenece a la familia de los hidróxidos, en particular, una base elegida de entre el hidróxido de litio, el hidróxido de sodio, el hidróxido de potasio, el hidróxido de rubidio, el hidróxido de cesio, el hidróxido de francio, un hidróxido de mono-, di-, tri- o tetra-alkilamonio y sus mezclas.

Según un modo de realización particular de la invención, la base eventualmente añadida en la composición tampón es hidróxido de sodio.

Ventajosamente, se añade lo suficientemente de base en la composición tampón como para que su pH sea superior o igual a 9,0, preferentemente comprendido entre 9,0 y 11,0 y más preferentemente comprendido entre 9,0 y 10,0, por ejemplo, comprendido entre 9,3 y 9,5 y todavía más preferentemente un pH de 9,4 o 9,5. Un pH alcalino superior a 9 permite obtener unas fracciones de hemoglobinas cargadas negativamente (estando el punto isoeléctrico de las hemoglobinas comprendido entre 6,05 y 7,63).

Según un modo de realización particular de la invención, la sal eventualmente presente en la composición tampón de la invención es una sal de sodio, preferentemente el cloruro de sodio. La composición tampón puede incluir, por ejemplo, 2,5 g/l de cloruro de sodio.

Según un modo de realización particular de la invención, cuando la composición tampón incluye putrescina, en concreto, putrescina pura, incluye, igualmente, una sal (en particular, una sal de sodio), preferentemente cloruro de

sodio, por ejemplo, 2,5 g/l de cloruro de sodio.

Según otro modo de realización particular de la invención, la composición tampón incluye clorhidrato de putrescina, no incluye cloruro de sodio y preferentemente no incluye ninguna sal.

- 5 Según un modo de realización particular de la invención, la composición tampón comprende o consiste en:
- 200 mM de CAPSO;
 - 10 mM de putrescina (por ejemplo, ya sea, putrescina 2HCl, ya sea putrescina pura y cloruro de sodio);
 - 10 - 50 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico;
 - agua; y
 - llegado el caso, una base, por ejemplo, el hidróxido de sodio, para ajustar el pH, por ejemplo, a un valor superior a 9 o 10 y preferentemente a un valor de 10,2;

- 15 o, más preferentemente, en:
- 200 mM de CAPSO;
 - 15 mM de putrescina (por ejemplo, ya sea, putrescina 2HCl, ya sea putrescina pura y cloruro de sodio);
 - 20 - 100 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico;
 - agua; y
 - llegado el caso, una base, por ejemplo, el hidróxido de sodio, para ajustar el pH, por ejemplo, a un valor superior a 9 o 10 y preferentemente a un valor de 10,2;

- o, también más preferentemente, en:
- 25 - 200 mM de CHES;
 - 20 mM de putrescina (por ejemplo, ya sea putrescina 2HCl, ya sea putrescina pura y cloruro de sodio);
 - 30 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico;
 - agua; y
 - 30 - llegado el caso, una base, por ejemplo, el hidróxido de sodio, para ajustar el pH, por ejemplo, a un valor superior a 9 y preferentemente a un valor de 9,4.

Según un modo de realización particular de la invención, la composición tampón comprende o consiste en los constituyentes indicados más arriba, en las concentraciones indicadas más arriba y una o varias sales, en particular, cloruro de sodio, por ejemplo, 2,5 g/l de cloruro de sodio.

Como se ilustra en la parte ejemplo, unas composiciones tampón de este tipo permiten obtener una separación perfecta de la hemoglobina HbA_{1c} de las otras hemoglobinas presentes en la muestra biológica analizada, así como una separación entre ellas de las diferentes fracciones menores (de las cuales la HbA_{1a}, la HbA_{1b} y la HbA_{1c}) no igualada en el campo de la electroforesis capilar en solución libre.

La expresión "muestra biológica" designa, en la presente solicitud, cualquier fluido biológico que incluye unos glóbulos rojos. Dicho fluido biológico puede provenir de un paciente humano sano o enfermo (por ejemplo, un paciente diabético) o ser de origen animal, en particular, provenir de un mamífero no humano (sano o enfermo). Dicho fluido biológico (humano o de mamífero no humano) puede ser, por ejemplo, sangre, en particular, sangre normal o no, lavada, decantada, centrifugada, hemolizada o total. Las muestras biológicas también pueden ser de origen sintético o purificado.

La invención es particularmente útil para el análisis de muestras de sangre, en particular, para el análisis de una muestra de sangre que proviene de un paciente diabético o de un mamífero no humano diabético.

Según un modo de realización particular, dicha muestra biológica comprende o consiste en varias hemoglobinas, en particular, varias hemoglobinas glicosiladas que incluyen un residuo de glucosa unido al aminoácido que se encuentra en posición N-terminal sobre al menos una cadena de globina (por ejemplo, sobre las cadenas beta) y más particularmente hemoglobina A_{1c}.

La muestra biológica utilizada se puede diluir previamente al análisis por electroforesis capilar con una solución de dilución apropiada, por ejemplo, una solución hemolizante y/o una solución de tampón de análisis, en particular, la composición tampón empleada en el marco de la invención. El análisis se realiza preferentemente a partir de una muestra de sangre hemolizada.

Según otro modo de realización particular, la muestra biológica se diluye, en un primer momento, en una solución hemolizante, luego, en la composición tampón empleada en el marco de la invención.

65 La expresión "solución hemolizante" designa, en la presente solicitud, una solución capaz de provocar la hemólisis de los glóbulos rojos, es decir, la destrucción de los glóbulos rojos y de liberar, de este modo, la hemoglobina. Puede

permitir, según su composición, una lisis total de los glóbulos rojos, usando eventualmente un escaso movimiento mecánico adicional (vórtice, agitación,...). La solución hemolizante puede comprender unos aditivos habituales de lisis celular, como, por ejemplo, el Triton X100, que se utiliza comúnmente a una concentración de 1 g/L. La solución hemolizante puede comprender, además, opcionalmente un compuesto capaz de complejar específicamente unos
 5 residuos de glucosa de hemoglobinas glicosiladas y de aportarles unas cargas negativas a pH alcalino tal como se define en la presente solicitud.

A título de ejemplo, la solución hemolizante se puede elegir de entre el grupo constituido por la solución hemolizante Capillarys® Hemoglobin(e) de Sebia, la solución hemolizante MINICAP® Hemoglobin(e) de Sebia, la solución
 10 hemolizante Hydragel® HbA_{1c} de Sebia, el agua pura, el agua adicionada con tensioactivo, en particular, el agua adicionada con Triton X100 (por ejemplo, 1 g/L de triton X100) y sus mezclas.

El método de análisis por electroforesis capilar de la invención comprende las siguientes etapas:

- 15 a) la introducción, en un capilar de electroforesis, de una composición tampón tal como se define en reivindicación 1 y de la muestra biológica; y
 b) la separación de los constituyentes de dicha muestra biológica por electroforesis capilar.

Estas dos etapas están precedidas, generalmente, por una etapa de dilución de la muestra biológica, por ejemplo, en
 20 una solución hemolizante. Esta etapa de dilución puede realizarse, en concreto, en el soporte de muestra, por ejemplo, en una barra Capillarys® (Sebia) o en la cúpula MINICAP® (Sebia).

En la etapa a), la composición tampón y la muestra biológica se pueden introducir por separado (simultáneamente o no) en un mismo capilar de electroforesis, estando la mezcla realizada, entonces, en el capilar. Se puede, por ejemplo,
 25 introducir, en el capilar de electroforesis, en primer lugar, la composición tampón empleada en el marco de la invención, luego, la muestra.

Alternativamente, la muestra biológica se puede introducir en un capilar de electroforesis en la etapa a) en forma de
 30 una mezcla con la composición tampón.

Según el tipo de aparato de electroforesis capilar utilizado y en función del número de análisis a realizar, se utiliza un solo capilar o varios capilares en paralelo. Cuando se dispone de un solo capilar, este capilar se utiliza, generalmente,
 35 varias veces sucesivamente, para poder realizar varios análisis. Por supuesto, cuando se utilizan varios capilares, llegado el caso, se pueden realizar varias migraciones electroforéticas sucesivas, en el transcurso de las que se utilizan varios capilares en paralelo.

La etapa de separación de los constituyentes de la muestra biológica por electroforesis capilar consiste, en concreto,
 40 en aplicar al(a los) capilar(es) un campo eléctrico de voltaje suficiente para permitir la separación de una o varias hemoglobina(s) glicosilada(s) de interés de las otras proteínas y, en particular, de las otras hemoglobinas que pueden estar presentes en la muestra biológica.

Las condiciones de realización de la electroforesis capilar en vena líquida son las condiciones usualmente implementadas por el experto en la materia para las etapas de introducción de la muestra y de la composición tampón
 45 en el o los capilar(es) y de separación de los constituyentes de la muestra por migración electroforética. El campo eléctrico aplicado puede ser, por ejemplo, de alrededor de 400 V/cm. Habitualmente, pueden incluir un lavado de los capilares por una solución de lavado, un lavado con la composición tampón utilizada para el análisis, una o unas dilución(ones) eventual(es) de la muestra, la introducción de la muestra en el o los capilar(es), la migración y la detección. Estas etapas pueden realizarse por unos autómatas.

Unas condiciones de realización de una electroforesis capilar son, por ejemplo, las condiciones apropiadas para utilizar
 50 el autómata Capillarys® de Sebia o MINICAP® de Sebia.

Según la invención, la etapa de separación de los constituyentes de la muestra biológica está seguida por una etapa
 55 de detección de una o varias proteína(s), en particular, de una o varias hemoglobinas presente(s) en la muestra biológica y, más particularmente, de una o varias hemoglobina(s) glicosilada(s) de interés presente(s) en la muestra biológica, por ejemplo, la hemoglobina A1c.

Esta etapa de detección se puede hacer, en concreto, midiendo la absorbancia, por ejemplo, a una longitud de onda
 60 de alrededor de 415 nm, específica de la hemoglobina; las hemoglobinas pueden analizarse a una longitud de onda de alrededor de 200 nm, pero para evitar unas interferencias con, en concreto, las proteínas plasmáticas, se analizan preferentemente a una longitud de onda de 415 nm.

En el marco de la realización de la invención, la presentación de los resultados de la separación electroforética se
 65 puede hacer como se ilustra en los ejemplos, en forma de perfiles electroforéticos generados a partir de una señal de detección proporcional a la cantidad de hemoglobina detectada. De este modo, el método de la invención comprende una etapa de generación de un electroferograma a partir de la señal de detección.

Como se ha indicado anteriormente, cuando está presente en la muestra biológica analizada, se puede cuantificar una hemoglobina de interés. Para hacer esto, se determina la superficie del pico correspondiente a dicha hemoglobina.

5 De este modo, dicho método, igualmente, comprende, generalmente, una etapa de determinación, en particular, a partir del electroferograma, de la cantidad de una o varias hemoglobina(s) presente(s) en la muestra biológica y/o de la proporción de una o varias hemoglobina(s) presente(s) en la muestra biológica con respecto a la cantidad total de proteínas, a la cantidad total de hemoglobina y/o a la cantidad de ciertas hemoglobinas (por ejemplo, con respecto a la cantidad de HbA o de HbA₀) presentes en la muestra biológica. En concreto, se puede determinar la proporción de hemoglobina glicosilada A_{1c}, S_{1c} y/o C_{1c} presente en la muestra biológica con respecto a la cantidad total de todas las hemoglobinas o con respecto a la cantidad de ciertas hemoglobina(s) presente(s) en la muestra biológica, por ejemplo, con respecto a la cantidad total de hemoglobina A, S y/o C respectivamente.

15 En un modo de realización particular de la invención, esta dosificación se puede obtener directamente a partir del perfil electroforético.

Según un modo de realización particular de la invención, el método de análisis comprende, además, una etapa de cuantificación de una o varias hemoglobina(s) presente(s) en la muestra biológica analizada con respecto a uno o varios calibrador(es) estandarizado(s) (por ejemplo, una o varias muestras biológicas de referencia); esto permite estandarizar los resultados.

20 De este modo, con el fin de obtener un nivel de precisión elevado durante la dosificación, cada capilar se calibra, generalmente, en cada arranque del aparato de electroforesis utilizando unas muestras biológicas de referencia (por ejemplo, unas muestras estándar que contienen unas concentraciones conocidas de diferentes fracciones de hemoglobina glicosilada naturales y/o sintéticas y, llegado el caso, purificadas). Por ejemplo, para dosificar la HbA_{1c}, se utilizan, generalmente, al menos dos calibradores, por ejemplo, un primer calibrador que comprende una fuerte concentración conocida de HbA_{1c} y un segundo calibrador que comprende una escasa concentración conocida de HbA_{1c}. Entonces, se mide, con cada capilar del aparato de electroforesis, la cantidad de HbA_{1c} presente en cada calibrador. Esto permite establecer, para cada capilar, una curva de regresión (sobre al menos dos puntos), que permitirá, a continuación, normalizar las mediciones efectuadas utilizando estos diferentes capilares. Esto permite, igualmente, estandarizar los resultados obtenidos con respecto a un método de referencia, utilizando los valores de HbA_{1c} determinados por este método para los calibradores.

35 Según un modo de realización particular de la invención, la electroforesis capilar realizada es del tipo electroforesis capilar en solución libre, en particular, del tipo electroforesis capilar en solución libre en capilar(es) desnudo(s).

Del punto de vista de los materiales utilizados para los capilares, estos son habituales en electroforesis capilar. El especialista sabrá adaptar la naturaleza del capilar y su tamaño a las necesidades del análisis.

40 Por ejemplo, en un modo de realización particular, el o los capilar(es) de electroforesis es(son) de sílice fundida.

45 Se describe, igualmente, la utilización del método de análisis por electroforesis capilar según la presente solicitud para separar una o varias hemoglobina(s) glicosilada(s) que incluyen glucosa y, más precisamente, una o varias hemoglobina(s) glicosilada(s) que incluyen cada una, sobre una o varias cadena(s) de globina (por ejemplo, sobre las cadenas beta), uno o varios residuo(s) de glucosa unido(s) al aminoácido que se encuentra en posición N-terminal, de otras proteínas, en particular, de al menos otra hemoglobina y preferentemente de las otras hemoglobinas presente(s) en una muestra biológica y, llegado el caso, para dosificar dicha o dichas hemoglobina(s) glicosilada(s).

50 La presente invención tiene como objeto, igualmente, una composición tampón apropiada para el análisis, por electroforesis capilar, de una muestra biológica que comprende unas hemoglobinas y, en particular, una o varias hemoglobina(s) glicosilada(s) que incluyen una o varias glucosa sobre una o sobre varias cadenas de beta globina, siendo la composición tampón tal como se define en reivindicación 12 o en reivindicación 13.

55 Dicha composición tampón es, en concreto, la utilizada para implementar el método de análisis por electroforesis capilar de una muestra biológica presentado en la presente solicitud.

60 Según un modo de realización particular de la invención, la composición tampón comprende, a título de compuesto capaz de complejar específicamente unos residuos de glucosa y de aportar unas cargas eléctricas negativas a pH alcalino, un derivado borónico de ácido policarboxílico, en particular, un ácido dicarboxílico o un ácido tricarboxílico, por ejemplo, el ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico.

65 Según otro modo de realización particular de la invención, la composición tampón comprende, además del compuesto capaz de complejar específicamente unos residuos de glucosa y de aportar unas cargas eléctricas negativas a pH alcalino,

- un retardador de flujo; y/o

- un compuesto tampón que tiene pKa comprendido entre 8,0 y 11,0; y/o
- una base; y/o
- una sal (en particular, una sal de sodio, por ejemplo, cloruro de sodio); y/o
- una solución de dilución apropiada, por ejemplo, agua.

5

Estos diferentes constituyentes pueden ser tales como se definen en una de las reivindicaciones 4 a 8.

10 Según un modo de realización particular de la invención, la composición tampón tiene un pH superior o igual a 9,0, preferentemente un pH comprendido entre 9,0 y 11,0 y más preferentemente un pH comprendido entre 9,0 y 10,0, por ejemplo, un pH comprendido entre 9,3 y 9,5 y también más preferentemente un pH de 9,4. Un pH de este tipo se puede obtener, en concreto, por el aporte de una cantidad suficiente de una base tal como se ha definido más arriba.

15 Las composiciones tampón de la invención se preparan de forma habitual para unas composiciones de tampón de análisis, a saber, por agregación de los constituyentes en forma líquida o sólida a diluir, a un soporte aceptable. De forma habitual, el soporte es agua, destilada o desmineralizada.

20 La presente invención se refiere, además, a un estuche (o kit) tal como se define en reivindicación 14, que comprende una composición tampón de la invención y, llegado el caso, unas instrucciones de utilización, para realizar el análisis electroforético. En otros términos, el estuche de la invención puede comprender o consistir en una composición tampón tal como se reivindica y un material de embalaje y, llegado el caso, unas instrucciones de utilización.

25 El estuche de la invención puede comprender, además, una o varias solución(ones) de lavado de los capilares y/o una o varias barra(s) de dilución y/o una o varias solución(ones) apropiada(s) para diluir la muestra biológica a analizar (por ejemplo, una solución hemolizante, en particular, una solución hemolizante tal como se define en la presente solicitud) y/o una o varias muestra(s) biológica(s) de referencia (por ejemplo, unas fracciones glicosiladas naturales y/o sintéticas y, llegado el caso, purificadas) que permiten calibrar cada capilar.

30 La presente solicitud describe, igualmente, la utilización de una composición tampón tal como se define en la presente solicitud y/o de un estuche tal como se define en la presente solicitud, para el análisis, por electroforesis capilar, de hemoglobinas glicosiladas (una o varias) que incluyen uno o varios residuo(s) de glucosa, en particular, de unas hemoglobinas A_{1c}, S_{1c} y C_{1c}, contenidas en una muestra biológica que comprende una o varias hemoglobina(s).

35 La presente invención tiene como objeto, igualmente, como se define en reivindicación 15, la utilización de una composición tampón tal como se define en las reivindicaciones y/o de un estuche tal como se define en las reivindicaciones, para separar, por electroforesis capilar, una o varias hemoglobina(s) glicosilada(s) que incluye al menos una cadena de beta globina que incluye un residuo de glucosa unido al aminoácido que se encuentra en posición N-terminal y, más particularmente, para separar, por electroforesis capilar, la hemoglobina A_{1c}, de otras proteínas, en particular, de al menos otra hemoglobina y preferentemente de las otras hemoglobinas presente(s) en una muestra biológica y, llegado el caso, para dosificar la o dichas hemoglobina(s) separada(s) de este modo.

40 La composición tampón tal como se define en las reivindicaciones, el estuche tal como se define en las reivindicaciones son apropiados, igualmente, para una utilización, por ejemplo, en el marco de un método de la invención, para el diagnóstico de la diabetes en un humano o un mamífero no humano y/o para el seguimiento del equilibrio glucémico de un humano o de un mamífero no humano (en particular, un sujeto diabético), como se define en reivindicación 16, en concreto, para evaluar la eficacia de un tratamiento contra la diabetes y/o adaptar un tratamiento contra la diabetes en un sujeto diabético. La o las muestra(s) biológica(s) analizadas provienen, entonces, de dicho humano o de dicho mamífero no humano.

50 El término diabetes tal como se utiliza en la presente solicitud designa una diabetes de tipo 1 y/o una diabetes de tipo 2.

55 La presente solicitud describe, igualmente, la utilización de una composición tampón, de un estuche y/o de un compuesto capaz de complejar específicamente unos residuos de glucosa de hemoglobinas glicosiladas y de aportar unas cargas negativas a pH alcalino, para la fabricación de un kit de diagnóstico. Dicho kit de diagnóstico puede utilizarse, en concreto, para el diagnóstico de la diabetes en un humano o de un mamífero no humano y/o para controlar el equilibrio glucémico de un humano o de un mamífero no humano, en particular, un sujeto diabético. Dicho kit puede permitir, de este modo, evaluar la eficacia de un tratamiento contra la diabetes en un humano o un mamífero no humano que padece diabetes y/o adaptar un tratamiento contra la diabetes en un sujeto diabético.

60 La tasa de HbA_{1c} está, generalmente, comprendida entre un 4 y un 6 % (esto es, 20 a 42 mmoles de HbA_{1c} por moles de hemoglobina en la sangre) en un humano no diabético y superior a un 7 % en un paciente diabético (en ausencia de tratamiento).

65 En caso de tasa de HbA_{1c} comprendida entre un 6 y un 7 % (esto es, una concentración de 42 a 53 mmoles de HbA_{1c} por moles de hemoglobina en la sangre), se aconseja establecer un tratamiento antidiabético.

Más allá del umbral de un 8 %, que equivale a una concentración de 64 mmoles de HbA_{1c} por moles de hemoglobina en la sangre (Panteghini y John, 2007), el paciente se expone a un riesgo incrementado de desarrollar una de las complicaciones de la diabetes (microangiopatía, macroangiopatía...). Entonces, se aconseja modificar el tratamiento antidiabético del paciente.

5 Otras características y ventajas de la invención aparecen en los ejemplos que siguen, así como en las figuras que ilustran la realización de la invención.

10 Descripción de las figuras

Figura 1: electroferograma obtenido en CE Agilent a partir de una muestra de sangre humana cualquiera utilizando el tampón de análisis descrito en la patente US 5.599.433, que contiene 100 mM de CAPS y 300 mM de ácido bórico (pH: 11,00; temperatura: 24 °C; voltaje: 6,1 kV, esto es, 190 V/cm; inyección: 5 kPa (50 mbar) 20 s).

15 Figura 2: perfiles electroforéticos estándar A_{1a,b} y A_{1c} obtenidos en CE Agilent a partir de muestras de referencia que contienen diferentes fracciones de hemoglobina glicosilada purificadas utilizando el tampón de análisis descrito en la patente US 5.599.433, que contiene 100 mM de CAPS y 300 mM de ácido bórico (pH: 11; temperatura: 24 °C; voltaje: 6,1 kV, esto es, 190 V/cm; inyección: 5 kPa (50 mbar) 20 s).

20 Figura 3: perfiles electroforéticos estándar A_{1a,b} y A_{1c} obtenidos en CE Agilent a partir de muestras de referencia que contienen diferentes fracciones de hemoglobina glicosilada purificadas, utilizando una composición tampón que contiene 200 mM de CAPSO y 10 mM de putrescina, pero no compuesto de borato, ni compuesto de boronato (pH: 10,20; temperatura: 24 °C; voltaje: 6,1 kV, esto es, 190 V/cm; inyección: 5 kPa (50 mbar) 20 s).

25 Figura 4: perfiles electroforéticos estándar A_{1a,b} y A_{1c} obtenidos en CE Agilent a partir de muestras de referencia que contienen diferentes fracciones de hemoglobina glicosilada purificadas, utilizando una composición tampón que contiene 200 mM de CAPSO, 10 mM de putrescina y 50 mM de borato (pH: 10,20; temperatura: 24 °C; voltaje: 6,1 kV, esto es, 190 V/cm; inyección: 5 kPa (50 mbar) 20 s).

30 Figura 5: perfiles electroforéticos estándar A_{1a,b} y A_{1c} obtenidos en CE Agilent a partir de muestras de referencia que contienen diferentes fracciones de hemoglobina glicosilada purificadas, utilizando una composición tampón que contiene 200 mM de CAPSO, 10 mM de putrescina y 50 mM de ácido 3-CarboxiFenilBorónico (pH: 10,20; temperatura: 24 °C; voltaje: 6,1 kV, esto es, 190 V/cm; inyección: 5 kPa (50 mbar) 20 s).

35 Figura 6: perfiles electroforéticos estándar A_{1a,b} y A_{1c} obtenidos en CE Agilent a partir de muestras de referencia que contienen diferentes fracciones de hemoglobina glicosilada purificadas, utilizando una composición tampón que contiene 200 mM de CAPSO, 10 mM de putrescina y 50 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico (pH: 10,20; temperatura: 24 °C; voltaje: 6,1 kV, esto es, 190 V/cm; inyección: 5 kPa (50 mbar) 20 s).

40 Figura 7: perfiles electroforéticos estándar A_{1a,b} y A_{1c} obtenidos en CE Agilent a partir de muestras de referencia que contienen diferentes fracciones de hemoglobina glicosilada purificadas, utilizando una composición tampón que contiene 200 mM de CAPSO, 15 mM de putrescina y 100 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico (pH: 10,20; temperatura: 30 °C; voltaje: 10 kV, esto es, 310 V/cm; inyección: 5 kPa (50 mbar) 20 s).

45 Figura 8: perfiles electroforéticos estándar A₀, A_{1a,b} y A_{1c} obtenidos en CE Agilent a partir de muestras de referencia que contienen HbA₀ y/o diferentes fracciones de hemoglobina glicosilada purificadas, utilizando una composición tampón que contiene 200 mM de CHES, 20 mM de putrescina y 30 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico a pH: 9,40. Capilar de sílice fundida, no recubierto (temperatura: 34 °C; voltaje: 17,3 kV, esto es, 520 V/cm; inyección 5 kPa (50 mbar) 20 s).

50 Figura 9: perfiles electroforéticos estándar A₀, A_{1a,b} y A_{1c} obtenidos en CE Agilent a partir de muestras de referencia que contienen HbA₀ y/o diferentes fracciones de hemoglobina glicosilada purificadas, utilizando una composición tampón que contiene 200 mM de CHES, 20 mM de putrescina y 30 mM de ácido 3,4-diCarboxiFenilBorónico a pH: 9,40. Capilar de sílice fundida, no recubierto (temperatura: 34 °C; voltaje: 17,3 kV, esto es, 520 V/cm; inyección 5 kPa (50 mbar) 20 s).

55 Figura 10: perfiles electroforéticos estándar A_{1a,b} y A_{1c} obtenidos en Capillarys® (Sebia) a partir de muestras de referencia que contienen diferentes fracciones de hemoglobina glicosilada purificadas, utilizando una composición tampón que contiene 200 mM de tampón CHES, 20 mM de putrescina y 30 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico, a pH 9,40. Capilar de sílice fundida, no recubierto (temperatura: 34 °C; voltaje: 9,4 kV, esto es, 520 V/cm; inyección 2 kPa (20 mbar) 6 s).

60 Figura 11: electroferograma obtenido en Capillarys® (Sebia) a partir de una muestra de sangre humana cualquiera diluida a 1/6 ° en la solución hemolizante (agua + 1 g/L de Triton X100), utilizando una composición tampón que contiene (A) 200 mM de tampón CAPSO, 10 mM de putrescina y 50 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico a pH 10,2 o, (B) 200 mM de tampón CHES, 20 mM de putrescina y 30 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico, a pH

9,40. Capilar de sílice fundida, no recubierto (temperatura: 34 °C; voltaje: 9,4 kV, esto es, 520 V/cm; inyección 0,8 kPa (8 mbar) 6 s).

5 Figura 12: estudio de la influencia de la concentración de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico en la composición tampón sobre la separación entre las hemoglobinas A_{1c} y A₀ (temperatura: 30 °C; voltaje: 10 kV, esto es, 310 V/cm).

10 Figura 13: electroferograma obtenido en Capillarys® (Sebia) a partir de una muestra de sangre humana cualquiera que comprende una variante HbE, diluida a 1/6 ° en la solución hemolizante (agua + 1 g/L de Triton X100), utilizando una composición tampón que contiene 200 mM de tampón CHES, 20 mM de putrescina y 30 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico, a pH 9,40 y un capilar de sílice fundida, no recubierto (temperatura: 34 °C; voltaje: 9,4 kV, esto es, 520 V/cm; inyección 0,8 kPa (8 mbar) 6 s).

15 Figura 14: electroferograma obtenido en Capillarys® (Sebia) a partir de un control AFSC diluido a 1/6 ° en la solución hemolizante (agua + 1 g/L de Triton X100), utilizando una composición tampón que contiene 200 mM de tampón CHES, 20 mM de putrescina y 30 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico, a pH 9,40 y un capilar de sílice fundida, no recubierto (temperatura: 34 °C; voltaje: 9,4 kV, esto es, 520 V/cm; inyección 0,8 kPa (8 mbar) 6 s).

20 Figura 15: electroferograma obtenido en Capillarys® (Sebia) a partir de una serie de sangres cualesquiera que incluyen unas variantes F y de Bart, diluida a 1/6 ° en la solución hemolizante (agua + 1 g/L de Triton X100), utilizando una composición tampón que contiene 200 mM de tampón CHES, 20 mM de putrescina y 30 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico, a pH 9,40 y un capilar de sílice fundida, no recubierto (temperatura: 34 °C; voltaje: 9,4 kV, esto es, 520 V/cm; inyección 0,8 kPa (8 mbar) 6 s).

25 Figura 16: electroferograma obtenido en Capillarys® (Sebia) a partir de una muestra de sangre humana cualquiera que comprende una variante HbD, diluida a 1/6 ° en la solución hemolizante (agua + 1 g/L de Triton X100), utilizando una composición tampón que contiene 200 mM de tampón CHES, 20 mM de putrescina y 30 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico, a pH 9,40 y un capilar de sílice fundida, no recubierto (temperatura: 34 °C; voltaje: 9,4 kV, esto es, 520 V/cm; inyección 0,8 kPa (8 mbar) 6 s).

30 Figura 17: comparación de los resultados obtenidos por los inventores por electroforesis capilar con el analizador Capillarys® (Sebia) con los resultados obtenidos por HPLC con el analizador Variant II Turbo® (Bio-Rad).

35 Figura 18A: Gel de agarosa HbA_{1c} realizado en autómatas Hydrasys® (Sebia). Pistas 1 y 2: calibrador A_{1c} escaso (un 5,0 %) y calibrador A_{1c} fuerte (un 10,8 %). Pistas 3 a 9: cualquier sangre total incubada 3 h a 37 °C con glucosa a una concentración de 0 g/L (referencia; pista 3), 1 g/L (pista 4), 5 g/L (pista 5), 10 g/L (pista 6), 20 g/L (pista 7), 30 g/L (pista 8) y 50 g/L (pista 9).

40 Figura 18B: perfiles de electroforesis capilar obtenidos con el analizador Capillarys® (Sebia) con las mismas muestras que las de la figura 18A. No obstante, el análisis no se ha realizado para la muestra que contiene 1 g/L de glucosa, ya que no hay una diferencia visible de gel (figura 18A). Muestras diluidas a 1/6 ° en la solución hemolizante (agua + 1 g/L de Triton X100), utilizando una composición tampón que contiene 200 mM de tampón CHES, 20 mM de putrescina y 30 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico, a pH 9,40 y un capilar de sílice fundida, no recubierto (temperatura: 34 °C; voltaje: 9,4 kV, esto es, 520 V/cm; inyección 0,8 kPa (8 mbar) 6 s).

45 Figura 18C: tabla recapitulativa de los valores de HbA_{1c} obtenidos en gel de agarosa y con el analizador Capillarys® (Sebia) para los análisis de las sangres presentados en las figuras 18A y 18B.

Ejemplos

A. MATERIAL Y MÉTODOS

50

ELECTROFORESIS CAPILAR

55 El principio de separación es la electroforesis capilar en solución libre a pH alcalino (pH > 9), con el fin de obtener unas fracciones de hemoglobinas cargadas negativamente (el punto isoeléctrico de las hemoglobinas está comprendido entre 6,05 y 7,63).

60 La electroforesis capilar de muestras biológicas se realiza en un aparato de electroforesis capilar equipado con 8 capilares de sílice fundida de diámetro interno 25 micras, de longitud útil 16 cm y de longitud total 18 cm (sistema de electroforesis capilar Capillarys® (Sebia) o en un aparato de electroforesis capilar equipado con un capilar de sílice fundida de diámetro interno 25 micras, de longitud útil 24 cm y de longitud total 32 cm (sistema de electroforesis capilar ^{3D}CE de Agilent Technologies).

65 La detección se realiza a una longitud de onda de 415 nm. Las muestras de sangre se diluyen en una solución hemolizante (Triton X100 1 g/L en el agua) y se inyectan por inyección hidrodinámica. El capilar se lava antes de cada análisis por el hidróxido de sodio 0,25 M, luego, por la composición tampón.

COMPOSICIÓN TAMPÓN

5 Las composiciones tampón en las que se realiza la electroforesis capilar comprende agua, un compuesto tampón de pKa comprendido entre 8 y 11 (CAPS, CAPSO o CHES según los casos), una base que permite ajustar el pH al valor deseado, eventualmente un retardador de flujo (putrescina) y eventualmente un compuesto de borato (ácido bórico) o de boronato.

10 El ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico (3,5-dCPBA) se ha obtenido por parte de las compañías Combi-blocks Inc. (San Diego, EE.UU.) y Apollo Scientific Ltd (Cheshire, Reino Unido).

El ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico (3,4-dCPBA) se ha sintetizado por la compañía BoroChem SAS (Caen, Francia).

B. RESULTADOS

15 Ejemplo 1

Una electroforesis capilar se ha realizado a partir de una sangre humana cualquiera (que incluye unas hemoglobinas HbA₀, HbA₁ y HbA₂) diluida a 1/6^o en una solución hemolizante (1 g/L de Triton X100 disuelto en agua desmineralizada), utilizando el tampón de análisis descrito en la patente US 5.599.433, que contiene 100 mM de CAPS y 300 mM de ácido bórico, pH 11. El electroferograma obtenido se presenta en la figura 1. Se constata que la separación entre los picos de hemoglobinas es mala.

Ejemplo 2

25 Una electroforesis capilar se ha realizado a partir de muestras de referencia (Exocell, EE.UU.), que contiene diferentes fracciones de hemoglobina glicosilada purificadas (fracciones A₀ y A_{1c} o fracciones A₀, A_{1b} y A_{1a}), utilizando el tampón de análisis descrito en la patente US 5.599.433, que contiene 100 mM de CAPS y 300 mM de ácido bórico, pH 10,20. Los perfiles electroforéticos estándar A_{1a,b} y A_{1c} obtenidos se presentan en la figura 2. Aparece claramente que la separación entre las hemoglobinas HbA_{1c} y HbA_{1a,b} es insuficiente; el pico electroforético HbA_{1c} solapa los picos de HbA_{1a}/HbA_{1b}.

Ejemplo 3

35 Una electroforesis capilar se ha realizado a partir de muestras de referencia (Exocell, EE.UU.), que contiene diferentes fracciones de hemoglobina glicosilada purificadas (fracciones A₀ y A_{1c} o fracciones A₀, A_{1b} y A_{1a}), utilizando una composición tampón que contiene 200 mM de CAPSO y 10 mM de putrescina (pH 10,20), pero no compuesto de borato, ni compuesto de boronato. Los perfiles electroforéticos estándar A_{1a,b} y A_{1c} obtenidos se presentan en la figura 3. El pico correspondiente a HbA_{1c} comigra con el de HbA₀.

40 Ejemplo 4

Una electroforesis capilar se ha realizado a partir de muestras de referencia (Exocell, EE.UU.), que contiene diferentes fracciones de hemoglobina glicosilada purificadas (fracciones A₀ y A_{1c} o fracciones A₀, A_{1b} y A_{1a}), utilizando una composición tampón que contiene 200 mM de CAPSO, 10 mM de putrescina y 50 mM de borato (pH 10,20). Los perfiles electroforéticos estándar A_{1a,b} y A_{1c} obtenidos se presentan en la figura 4. El pico correspondiente a HbA_{1c} se encuentra entre los picos que corresponden a HbA₀ y HbA_{1a}/HbA_{1b} y está demasiado cerca del pico correspondiente a las otras HbA₁ para permitir una dosificación fiable de HbA_{1c}.

Ejemplo 5

50 Una electroforesis capilar se ha realizado a partir de muestras de referencia (Exocell, EE.UU.), que contiene diferentes fracciones de hemoglobina glicosilada purificadas (fracciones A₀ y A_{1c} o fracciones A₀, A_{1b} y A_{1a}), utilizando una composición tampón que contiene 200 mM de CAPSO, 10 mM de putrescina y 50 mM de ácido 3-CarboxiFenilBorónico (pH 10,20). Los perfiles electroforéticos estándar A_{1a,b} y A_{1c} obtenidos se presentan en la figura 5. El pico correspondiente a HbA_{1c} se encuentra entre los picos que corresponden a HbA_{1b} y HbA_{1a}.

Ejemplo 6

60 Una electroforesis capilar se ha realizado a partir de muestras de referencia (Exocell, EE.UU.), que contiene diferentes fracciones de hemoglobina glicosilada purificadas (fracciones A₀ y A_{1c} o fracciones A₀, A_{1b} y A_{1a}), utilizando una composición tampón que contiene 200 mM de CAPSO, 10 mM de DAB y 50 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico (pH 10,20). Los perfiles electroforéticos estándar A_{1a,b} y A_{1c} obtenidos se presentan en la figura 6. El pico correspondiente a HbA_{1c} se encuentra después de los picos que corresponden a HbA_{1b} y HbA_{1a}.

65 Ejemplo 7

Una electroforesis capilar se ha realizado a partir de muestras de referencia (Exocell, EE.UU.) que contienen diferentes fracciones de hemoglobina glicosilada purificadas (fracciones A₀ y A_{1c} o fracciones A₀, A_{1b} y A_{1a}), utilizando una composición tampón que contiene 200 mM de CAPSO, 15 mM de retardador de flujo (putrescina) y 100 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico (pH 10,20). Los perfiles electroforéticos estándar A_{1a,b} y A_{1c} obtenidos se presentan en la figura 7. Se constata que el pico correspondiente a HbA_{1c} se encuentra después de los picos que corresponden a HbA_{1b} y HbA_{1a} y es bien distinto de estos picos; la separación entre la hemoglobina HbA_{1c} y las hemoglobinas HbA_{1a} y HbA_{1b} es excelente.

Ejemplo 8

Una electroforesis capilar se ha realizado a partir de muestras de referencia que contienen HbA₀ y/o diferentes fracciones de hemoglobina glicosilada purificadas (fracciones A₀ y A_{1c} o fracciones A₀, A_{1b} y A_{1a}), utilizando una composición tampón que contiene 200 mM de CHES, 20 mM de retardador de flujo (putrescina) y 30 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico (a pH: 9,40). Los perfiles electroforéticos estándar A₀, A_{1a,b} y A_{1c} obtenidos se presentan en la figura 8. Se constata que el pico correspondiente a HbA_{1c} se encuentra después de los picos que corresponden a HbA₀, HbA_{1b} y HbA_{1a} y es bien distinto de estos picos; la separación entre la hemoglobina HbA_{1c} y las hemoglobinas HbA_{1a} y HbA_{1b} es excelente.

Ejemplo 9

Una electroforesis capilar se ha realizado a partir de muestras de referencia que contienen HbA₀ y/o diferentes fracciones de hemoglobina glicosilada purificadas (fracciones A₀ y A_{1c} o fracciones A₀, A_{1b} y A_{1a}), utilizando una composición tampón que contiene 200 mM de CHES, 20 mM de retardador de flujo (putrescina) y 30 mM de ácido 3,4-diCarboxiFenilBorónico (a pH: 9,40). Los perfiles electroforéticos estándar A₀, A_{1a,b} y A_{1c} obtenidos se presentan en la figura 9. Se constata que el pico correspondiente a HbA_{1c} se encuentra después de los picos que corresponden a HbA₀, HbA_{1b} y HbA_{1a} y es bien distinto de estos picos; la separación entre la hemoglobina HbA_{1c} y las hemoglobinas HbA_{1a} y HbA_{1b} es excelente.

Comparando los perfiles electroforéticos de los ejemplos 8 y 9, se constata que el ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico permite obtener un resultado ligeramente mejor en términos de separación de la HbA_{1c} con respecto a las otras fracciones, mientras que el ácido 3,4-diCarboxiFenilBorónico permite obtener un resultado ligeramente mejor en términos de enfoque.

Ejemplo 10

Una electroforesis capilar se ha realizado en Capillarys® (Sebia) a partir de muestras de referencia (Exocell, EE.UU.) que contienen diferentes fracciones de hemoglobina glicosilada purificadas (fracciones A₀ y A_{1c} o fracciones A₀, A_{1b} y A_{1a}), utilizando una composición tampón que contiene 200 mM de tampón CHES, 20 mM de putrescina y 30 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico, a pH 9,40. Los perfiles electroforéticos estándar A_{1a,b} y A_{1c} obtenidos se presentan en la figura 10. Se constata que el pico correspondiente a HbA_{1c} se encuentra después de los picos que corresponden a HbA_{1b} y HbA_{1a} y es bien distinto de estos picos; la separación entre la hemoglobina HbA_{1c} y las hemoglobinas HbA_{1a} y HbA_{1b} es excelente.

Ejemplo 11

Unos análisis por electroforesis capilar se han realizado a partir de una sangre humana cualquiera diluida a 1/6 ° en la solución hemolizante (agua + 1 g/L de Triton X100), utilizando una composición tampón que contiene ya sea 200 mM de tampón CAPSO, 10 mM de putrescina y 50 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico, a pH 10,20, ya sea, 200 mM de tampón CHES, 20 mM de putrescina y 30 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico, a pH 9,40. Los electroferogramas obtenidos en Capillarys® (Sebia) utilizando un capilar de sílice fundida, no recubierto, se presentan en las figuras 11A y 11B, respectivamente. Se observa en los 2 casos una separación perfecta de la hemoglobina HbA_{1c} de las otras formas de hemoglobinas.

Ejemplo 12

Se ha estudiado la influencia de la concentración de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico en la composición tampón sobre la separación entre las hemoglobinas A_{1c} y A₀. La composición tampón utilizada contenía 200 mM de CAPSO, 15 mM de Putrescina y 0 a 120 mM de 3,5-diCarboxiFenilBorónico. Los resultados se presentan en la figura 12. Se constata que la separación A_{1c}/A₀ aumenta con la concentración de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico.

Ejemplo 13

Unas electroforesis capilares se han realizado en Capillarys® (Sebia) a partir de cuatro muestras diferentes diluidas a 1/6 ° en la solución hemolizante (agua + 1 g/L de Triton X100): sangre humana cualquiera que comprende una variante HbE (figura 13), un control AFSC (figura 14), una serie de sangres cualesquiera que incluyen unas variantes F y de Bart (figura 15) y una sangre humana cualquiera que comprende una variante HbD (figura 16). La electroforesis capilar

se ha realizado en una composición tampón que contiene 200 mM de tampón CHES, 20 mM de putrescina y 30 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico, a pH 9,40, utilizando un capilar de sílice fundida, no recubierto.

Las figuras 13-16 muestran la ausencia de interferencias de las principales variantes de la hemoglobina (E, F, S, C, D y Bart) con la fracción HbA_{1c}. No obstante, se señala que, en el caso de la hemoglobina Bart, la resolución no es total entre las fracciones Hb Bart y HbA_{1c}. Por consiguiente, para poder dosificar la HbA_{1c} en presencia de Hb Bart, hay que poder cuantificar estas dos fracciones gracias a un método de integración adaptado. Si esto no es posible, será necesario alertar al usuario sobre este tema, en la eventualidad en que observara este tipo de perfil con resalte sobre el pico esperado.

Ejemplo 14

Los resultados obtenidos por electroforesis capilar por el método de la presente invención utilizando el analizador Capillarys® (Sebia) se han comparado con los resultados obtenidos con una de las técnicas de referencia: la HPLC con el analizador Variant II Turbo® (Bio-Rad).

La electroforesis capilar se ha realizado a partir de sangres totales diluidas a 1/6 ° en la solución hemolizante (agua + 1 g/L de Triton X100), en una composición tampón que contiene 200 mM de tampón CHES, 20 mM de putrescina y 30 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico, a pH 9,40.

La Figura 17 muestra la muy buena correlación de esta nueva técnica de análisis por electroforesis capilar con el análisis de la HbA_{1c} por HPLC con el Variant II turbo® de Bio-Rad. Después de calibración de los datos EC utilizando 2 calibradores (A_{1c} escasa y A_{1c} fuerte), los valores obtenidos por el método de la presente invención están muy cerca de los obtenidos por el método de referencia.

Ejemplo 15: Estudio que demuestra la ausencia de interferencia de la fracción lábil de la HbA_{1c} con la dosificación de la HbA_{1c} por el método de la presente invención.

En la hipótesis en que el compuesto que compleja la glucosa y que aporta unas cargas negativas a pH alcalino implementado en el marco del método de análisis de la presente invención fuera capaz de interactuar con la glucosa sanguínea (esta interacción es hipotética y no está demostrada), un estudio de la eventual interferencia de la glucosa libre sobre el resultado de la dosificación de la HbA_{1c} se ha realizado de la siguiente manera: una sangre cualquiera se ha incubado 3 horas a 37 °C con diferentes concentraciones de glucosa (de 0 a 50 g/L), para crear forma lábil de la HbA_{1c} (forma obtenida antes de reordenamiento de la molécula (reordenamiento de Amadori)). Una vez realizada la incubación, las muestras de sangres se han centrifugado y los gránulos obtenidos se han reconstituido en agua fisiológica y la solución hemolizante (15 mL de gránulo + 25 mL de agua fisiológica + 160 mL de solución hemolizante (agua + 1 g/L de Tritón X100)), luego, analizadas paralelamente en autómatas Hydrasys® de Sebia (gel HbA_{1c}) y en técnica Capillarys® (Sebia) utilizando la composición tampón que contiene 200 mM de tampón CHES, 20 mM de putrescina y 30 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico, a pH 9,40.

El gel HbA_{1c} obtenido por el análisis en autómatas Hydrasys® (véase figura 18A) permite confirmar la formación de fracción lábil de la HbA_{1c} que migra al mismo nivel que la HbA_{1c} y en concentración creciente a medida que aumenta la concentración de glucosa durante la incubación con la sangre. Hay que señalar que, en gel, en las condiciones normales de utilización definidas por Sebia, la fracción lábil no aparecería, en concreto, debido al pH ácido de la solución hemolizante.

Los análisis efectuados en Capillarys® (Sebia) con una composición tampón de la invención (200 mM de tampón CHES, 20 mM de putrescina y 30 mM de ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico, a pH 9,40), sobre las mismas muestras de sangres, muestran, a la inversa, que la dosificación no está perturbada por la presencia de glucosa libre, sea la que sea la concentración de glucosa incubada, en el rango estudiado (0 a 50 g/L): los perfiles y los valores de HbA_{1c} están sin cambios (véanse figuras 18B y 18C).

Referencias

Abraham, E.C.; Cameron, B.F.; Abraham, A.; Stallings, M., "Glycosylated hemoglobins in heterozygotes and homozygotes for hemoglobin C with or without diabetes", *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 104, 602-609, 1984.

Beccaria, L.; Chiumello, G.; Gianazza, E.; Luppis, B.; Righetti, P.G., "Hemoglobin A1c separation by isoelectric focusing", *American Journal of Hematology*, 4, 367-374, 1978.

Bosisio, A.; Righetti, P., "Determination of glycosylated haemoglobin by isoelectric focusing in non-linear pH gradients", *Journal of Chromatography*, 307, 103-110, 1984.

Doelman, C.; Siebelder, C.; Nijhof, W.; Weykamp, W.; Janssens, J.; Penders, T., "Capillary electrophoresis system for hemoglobin A1c determinations evaluated", *Clinical Chemistry*, 43, 4, 644-648, 1997.

- Hempe, JM.; Craver, RD., "Quantification of hemoglobin variants by capillary isoelectric focusing", *Clinical Chemistry*, 40,12, 2288-2295, 1994.
- 5 Hempe, JM.; Granger, JN.; Craver, RD., "Capillary isoelectric focusing of hemoglobin variants in the pediatric clinical laboratory", *Electrophoresis*, 18, 1785-1795, 1997.
- Janssens, J., "*Capillary electrophoresis detection and/or analysis method and unit*", EP 0 733 900 A2, 1996.
- 10 Janssens, J.; Chevigné, P.; Louis, P., "*Capillary electrophoresis method using initialized capillary and polyanion-containing buffer and chemical kit therefore*", Patente US 5.611.903, 1997.
- Menard, L; Dempsey, M.; Blankstein, L; Aleyassine, H.; Wacks, M.; Soeldner, J., "Quantitative determination of glycosylated hemoglobin A1c by agar gel electrophoresis", *Clinical Chemistry*, 26, 11, 1598-1602, 1980.
- 15 Molteni, S.; Frischknecht, H.; Thormann, W., "Application of dynamic capillary isoelectric focusing to the analysis of human hemoglobin variants", *Electrophoresis*, 15, 22-30, 1994.
- Panteghini, M. John, W.G., en nombre de la División Científica de la IFCC, "Implementation of haemoglobin A1c results traceable to the IFCC reference system: the way forward"., *Clin Chem Lab Med.*, 45(8), 942-4, 2007.
- 20 Simon, M.; Cuan J., "Hemoglobin A1c by isoelectric focusing", *Clinical Chemistry*, 28,1, 9-12, 1982.
- Siren, H.; Laitinen, P.; Turpeinen, U.; Karppinen, P., "Direct monitoring of glycohemoglobin A1c in the blood samples of diabetic patients by capillary electrophoresis. Comparison with an immunoassay method", *Journal of Chromatography A*, 979, 201-207, 2002.
- 25 Stickland, M.; Perkins, C; Wales, J" "The measurement of haemoglobin A1c by isoelectric focusing in diabetic patients", *Diabetologia*, 22, 315-317, 1982.
- 30 Wilson, D.H., Bogacz, J.P., Forsythe, C.M., Turk, P.J., Lane, T.L., Gates, R.C., Brandt, D.R. "Fully automated assay of glycohemoglobin with the Abbott IMx analyzer: novel approaches for separation and detection", *Clin Chem.*, 39(10), 2090-7, 1993.

REIVINDICACIONES

1. Método de análisis por electroforesis capilar de una o varias hemoglobina(s) glicosilada(s) que incluye al menos una cadena de beta globina que incluye un residuo de glucosa unido al aminoácido que se encuentra en posición N-terminal, estando dichas una o varias hemoglobina(s) glicosilada(s) contenida(s) en una muestra biológica que comprende unas hemoglobinas, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:
- a. la introducción, en un capilar de electroforesis, de una composición tampón y de la muestra biológica; comprendiendo la composición tampón al menos un compuesto que compleja específicamente los residuos de glucosa unidos a un aminoácido que se encuentra en posición N-terminal en las hemoglobinas glicosiladas de la muestra biológica y aporta a esta o estas hemoglobina(s) glicosilada(s) varias cargas eléctricas negativas a pH alcalino, comprendiendo dicho compuesto dos o más de dos grupos funcionales:
- i. uno al menos de estos grupos funcionales que compleja específicamente uno o varios residuo(s) de glucosa, aportando, de este modo, una carga eléctrica negativa por residuo de glucosa complejoado y
- ii. el otro, uno de los otros o los otros grupo(s) funcional(es) que no complejan dicho o dichos residuo(s) de glucosa, confiriendo una o varias carga(s) eléctrica(s) negativa(s) a pH alcalino a dicha o a dichas hemoglobina(s) glicosilada(s),
- b. la separación de los constituyentes de la muestra biológica por electroforesis capilar; y
- c. la detección de una o varias hemoglobina(s) presente(s) en la muestra biológica y la generación de un electroferograma a partir de la señal de detección, que es proporcional a la cantidad de hemoglobina(s) detectada.
2. Método según la reivindicación 1, para el análisis por electroforesis capilar de la hemoglobina A_{1c} contenida en una muestra biológica que comprende unas hemoglobinas.
3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el compuesto que compleja específicamente unos residuos de glucosa de hemoglobinas glicosiladas de la muestra biológica y que aporta unas cargas negativas a pH alcalino incluye uno (o varios) grupo(s) boronilo y/o de boronato y, en particular, es:
- (i) un compuesto de boronato, de fórmula general $RB(OH)_2$ o $RB(OH)_3^-$, en la que el grupo R comprende al menos un arilo y/o un alquilo (lineal, ramificado o cíclico) y/o un aralquilo y/u otros grupos funcionales o heteroátomos y/o una combinación de estos y dicho grupo R aporta una o varias carga(s) eléctrica(s) negativa(s) a pH alcalino para cada residuo de glucosa complejoado con el grupo de boronato; o
- (ii) una sal de este compuesto de boronato.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la concentración, en la composición tampón, del compuesto que compleja específicamente unos residuos de glucosa de hemoglobina(s) glicosilada(s) de la muestra biológica y que aporta unas cargas negativas a pH alcalino, está en exceso estequiométrico con respecto a la cantidad total de proteínas, con respecto a la cantidad total de todas las hemoglobinas presentes en la muestra biológica o con respecto a la cantidad total de todas las hemoglobinas que incluyen glucosa presentes en la muestra biológica.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la composición tampón comprende, además, un retardador de flujo, en particular, un retardador de flujo que es una diamina alifática, más particularmente, una diamina alifática elegida de entre los 1,3-diaminopropano, 1,4-diaminobutano (putrescina), 1,5-diaminopentano (cadaverina), 1-6-diaminohexano, la espermina y la DETA o un derivado de esta diamina alifática, por ejemplo, una poliamina alifática, una poliamina cíclica o una sal de diamina alifática o una de sus mezclas y, más particularmente todavía, un retardador de flujo que es la putrescina o un derivado.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la composición tampón comprende, además:
- un compuesto tampón que tiene un pKa comprendido entre 8,0 y 11,0; y/o
 - una base; y/o
 - una sal, en particular, una sal de sodio, por ejemplo, cloruro de sodio; y/o
 - una solución de dilución apropiada, por ejemplo, agua.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la composición tampón tiene un pH superior o igual a 9, preferentemente entre 9,0 y 11,0 y más preferentemente un pH comprendido entre 9,0 y 10,0, por ejemplo, un pH de 9,4.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que:
- el compuesto que compleja específicamente unos residuos de glucosa de hemoglobinas glicosiladas y que aporta unas cargas negativas a pH alcalino incluye uno o varios grupos anionizables a pH alcalino, en particular, uno o varios carboxilato(s), carboxilo(s), sulfonato(s) y/o sulfonilo(s) y/o
 - el compuesto de boronato tal como se define en la reivindicación 3 es:

- un fenilboronato polisustituido,
 - en particular, un fenilboronato disustituido, por ejemplo, por unos grupos carboxilo(s) y/o sulfonilo(s),
 - más particularmente, un compuesto en el que el grupo R es un diácido, preferentemente un diácido carboxílico
- 5 - más particularmente todavía, un ácido di-CarboxiFenilBorónico, elegido preferentemente de entre el ácido 3,4-diCarboxiFenilBorónico y el ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico, más preferentemente el ácido 3,5-diCarboxiFenilBorónico y/o
- 10 - la concentración, en la composición tampón, del compuesto capaz de complejar específicamente unos residuos de glucosa de hemoglobina(s) glicosilada(s) y de aportar unas cargas negativas a pH alcalino está comprendida entre 0,10 y 100 mM, preferentemente entre 10 y 60 mM y más preferentemente entre 20 y 50 mM, por ejemplo, 30 mM y/o
- 15 - la concentración, en la composición tampón, del retardador de flujo tal como se define en la reivindicación 5 está comprendida entre 0,10 y 40 mM, preferentemente entre 10 y 30 mM y más preferentemente entre 15 y 25 mM, por ejemplo, 20 mM y/o
- el compuesto tampón tal como se define en la reivindicación 6 es un compuesto zwitteriónico, en particular, un compuesto elegido de entre el AMP, el AMPD, el AMPSO, la bicina, el CABS, el CAPS, el CAPSO, el CHES, el HEPBS, la metilamina, el TABS, el TAPS, la taurina, la tricina y el Tris, por ejemplo, el CHES, el CAPS o el CAPSO y/o
- 20 - la concentración, en la composición tampón, del compuesto tampón tal como se define en la reivindicación 6 está comprendida entre 20 y 500 mM, más preferentemente entre 50 y 400 mM y más preferentemente todavía entre 150 y 300 mM, por ejemplo, 200 mM.
- 25 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende, además:
- una etapa de determinación, en particular, a partir de un electroferograma tal como se define en la reivindicación 1, de la cantidad de una o varias hemoglobina(s) presente(s) en la muestra biológica y/o de la proporción de una o varias hemoglobina(s) presente(s) en la muestra biológica con respecto a la cantidad total de proteínas, a la cantidad total de hemoglobina o a la cantidad de ciertas hemoglobinas presentes en la muestra biológica y/o
- 30 - una etapa de cuantificación de una o varias hemoglobina(s) presente(s) en la muestra biológica con respecto a uno o varios calibrador(es) estandarizado(s).
- 35 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la muestra biológica es una muestra de sangre, en particular, una muestra de sangre normal o no, lavada, decantada, centrifugada o total, siendo dicha muestra, llegado el caso, hemolizada.
- 40 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la muestra biológica se diluye en una solución hemolizante, en particular, una solución hemolizante elegida de entre el grupo constituido por:
- la solución hemolizante Capillarys® Hemoglobin(e);
 - la solución hemolizante Hydragel® HbA_{1c};
 - la solución hemolizante MINICAP® Hemoglobin(e);
 - el agua pura;
 - el agua adicionada con tensioactivo, en particular, el agua adicionada con tritón; y
- 45 - sus mezclas.
- 50 12. Composición tampón apropiada para el análisis, por electroforesis capilar, de una o varias hemoglobinas glicosiladas que incluye un residuo de glucosa unido al aminoácido que se encuentra en posición N-terminal sobre las cadenas de beta globina, contenidas en una muestra biológica que comprende una o varias hemoglobina(s), comprendiendo dicha composición al menos un compuesto que compleja específicamente los residuos de glucosa unidos a un aminoácido que se encuentra en posición N-terminal de hemoglobinas glicosiladas y que aporta a estas hemoglobinas glicosiladas varias cargas eléctricas negativas a pH alcalino, estando dicha composición caracterizada por que el compuesto, que incluye uno (o varios) grupo(s) boronilo y/o de boronato, es:
- 55 (i) un compuesto de boronato, de fórmula general $RB(OH)_2$ o $RB(OH)_3^-$, en la que el grupo R comprende al menos un arilo y/o un alquilo (lineal, ramificado o cíclico) y/o un aralquilo y/u otros grupos funcionales o heteroátomos y/o una combinación de estos y dicho grupo R aporta dos o más de dos cargas eléctricas negativas a pH alcalino para cada residuo de glucosa complejoado con el grupo de boronato, en particular, el compuesto de boronato es un fenilboronato polisustituido; o
- 60 (ii) una sal de este compuesto de boronato.
- 65 13. Composición tampón según la reivindicación 12, que es tal como, además, se define en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8.
14. Estuche que comprende una composición tampón según la reivindicación 12 o 13 y, llegado el caso, unas instrucciones de utilización.

5 15. Utilización de una composición tampón tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o de un estuche según la reivindicación 14, para la separación, por electroforesis capilar, de una o varias hemoglobina(s) glicosilada(s) que incluye al menos una cadena de beta globina que incluye un residuo de glucosa unido al aminoácido que se encuentra en posición N-terminal, de otras proteínas, en particular, de al menos otra hemoglobina y preferentemente de las otras hemoglobinas presente(s) en una muestra biológica.

10 16. Utilización según la reivindicación 15, para el diagnóstico de la diabetes en un humano o un mamífero no humano y/o para el seguimiento del equilibrio glucémico de un mamífero humano o no humano.

Electroferograma(s) actual(es)

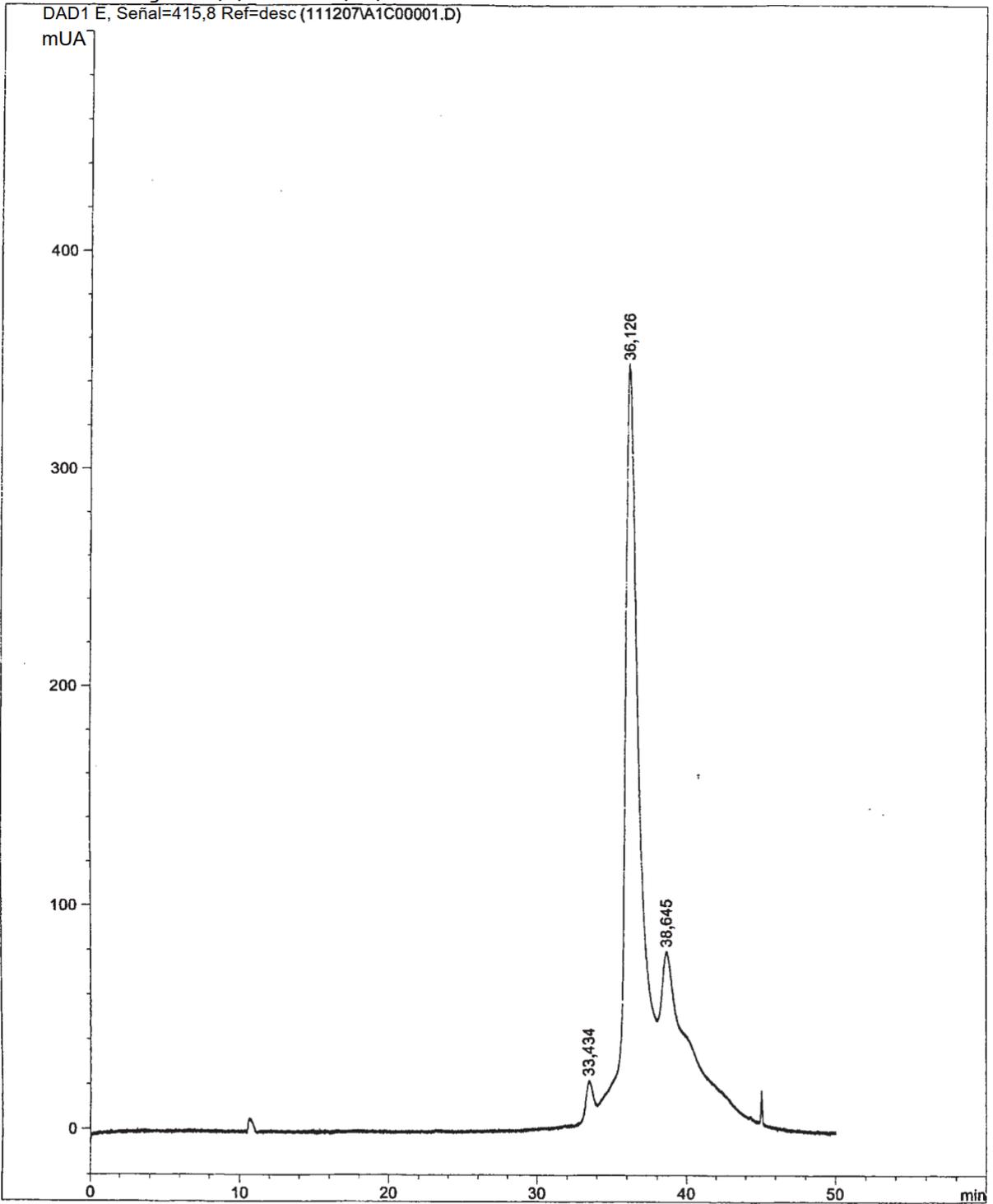


Figura 1

Electroferograma(s) actual(es)

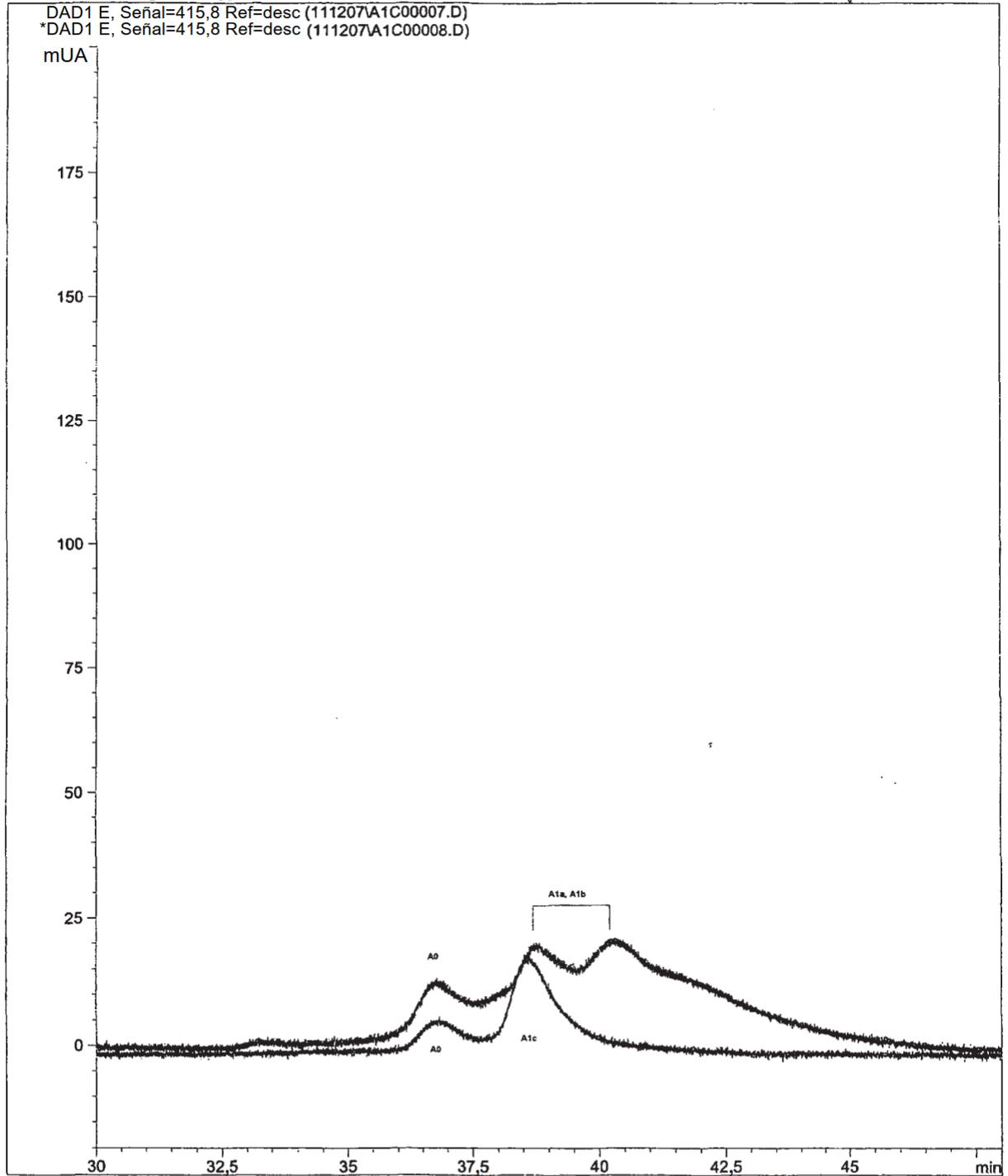


Figura 2

Electroferograma(s) actual(es)

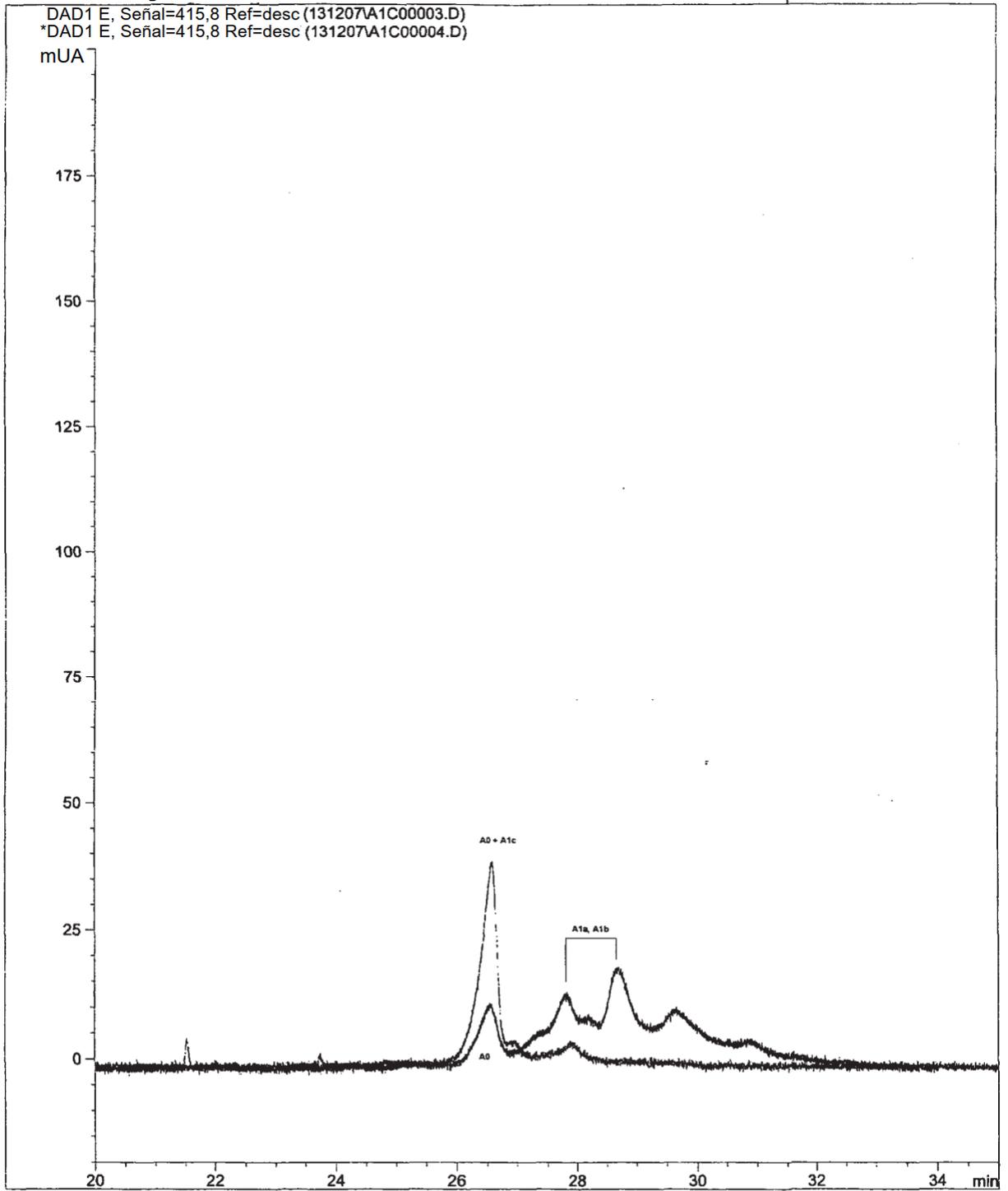


Figura 3

Electroferograma (s) actual (es)

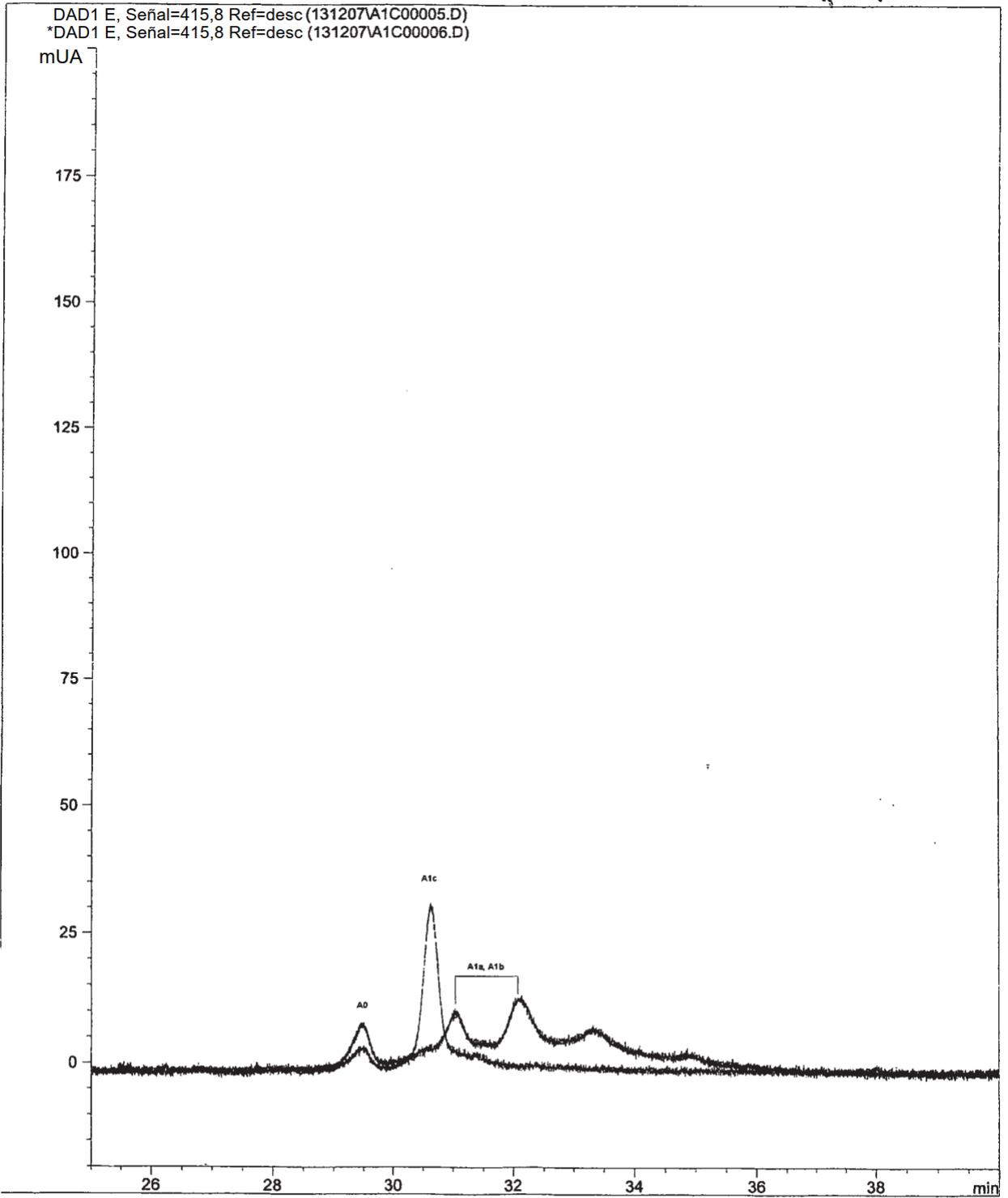


Figura 4

Electroferograma (s) actual (es)

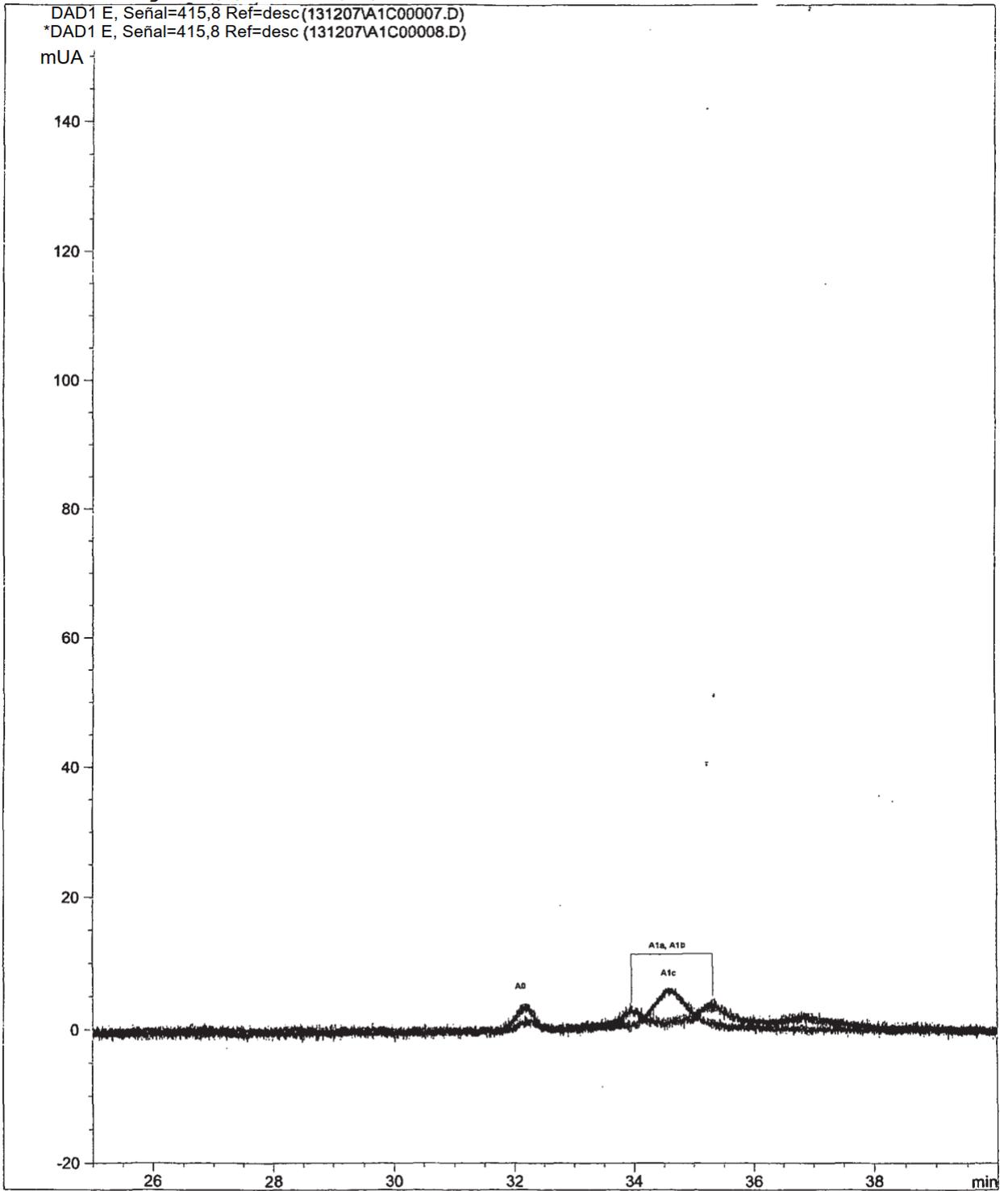


Figura 5

Electroferograma (s) actual (es)

DAD1 E, Señal=415,8 Ref=desc(131207A1C00009.D)
*DAD1 E, Señal=415,8 Ref=desc(131207A1C00010.D)

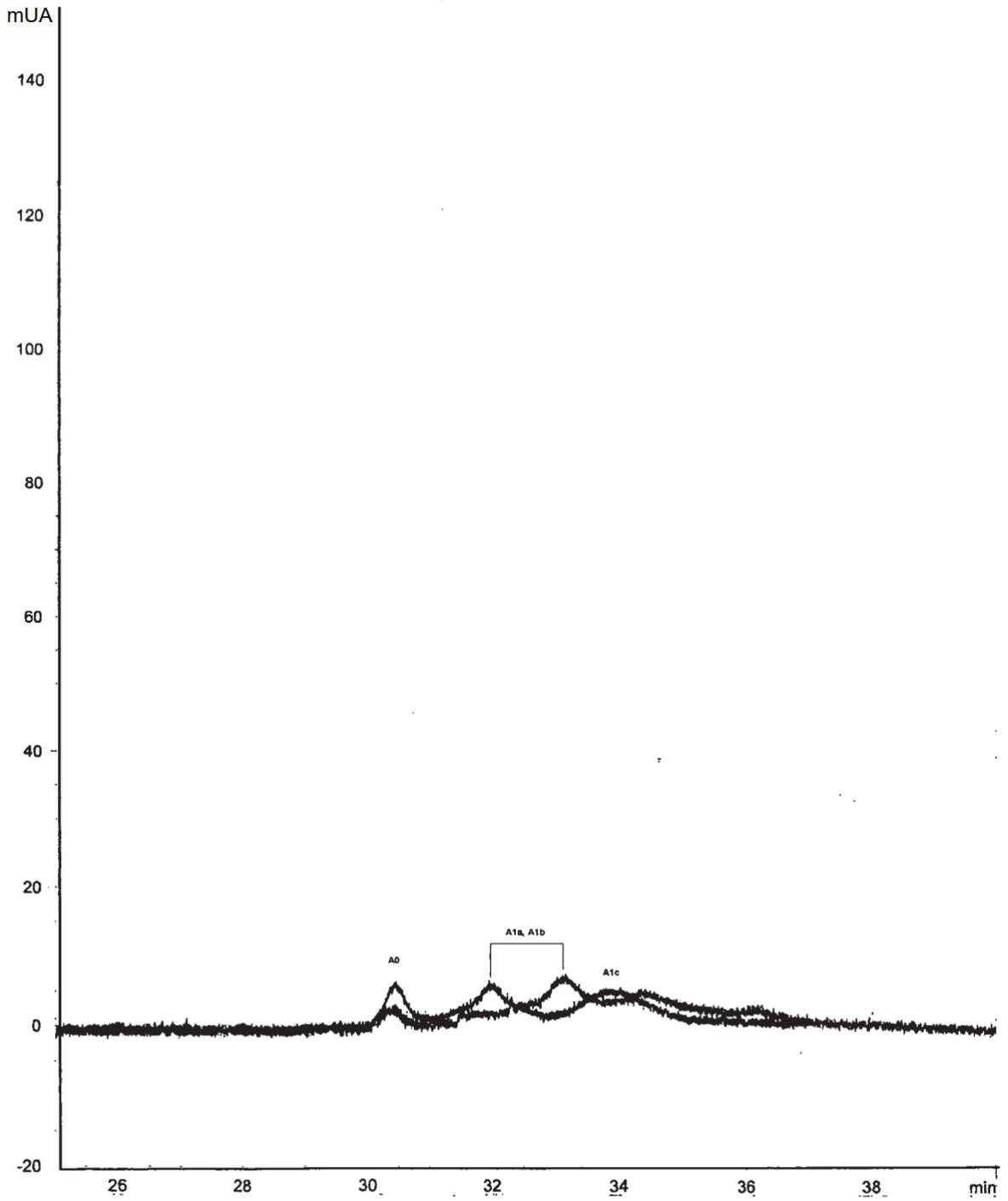


Figura 6

Electroferograma (s) actual (es)

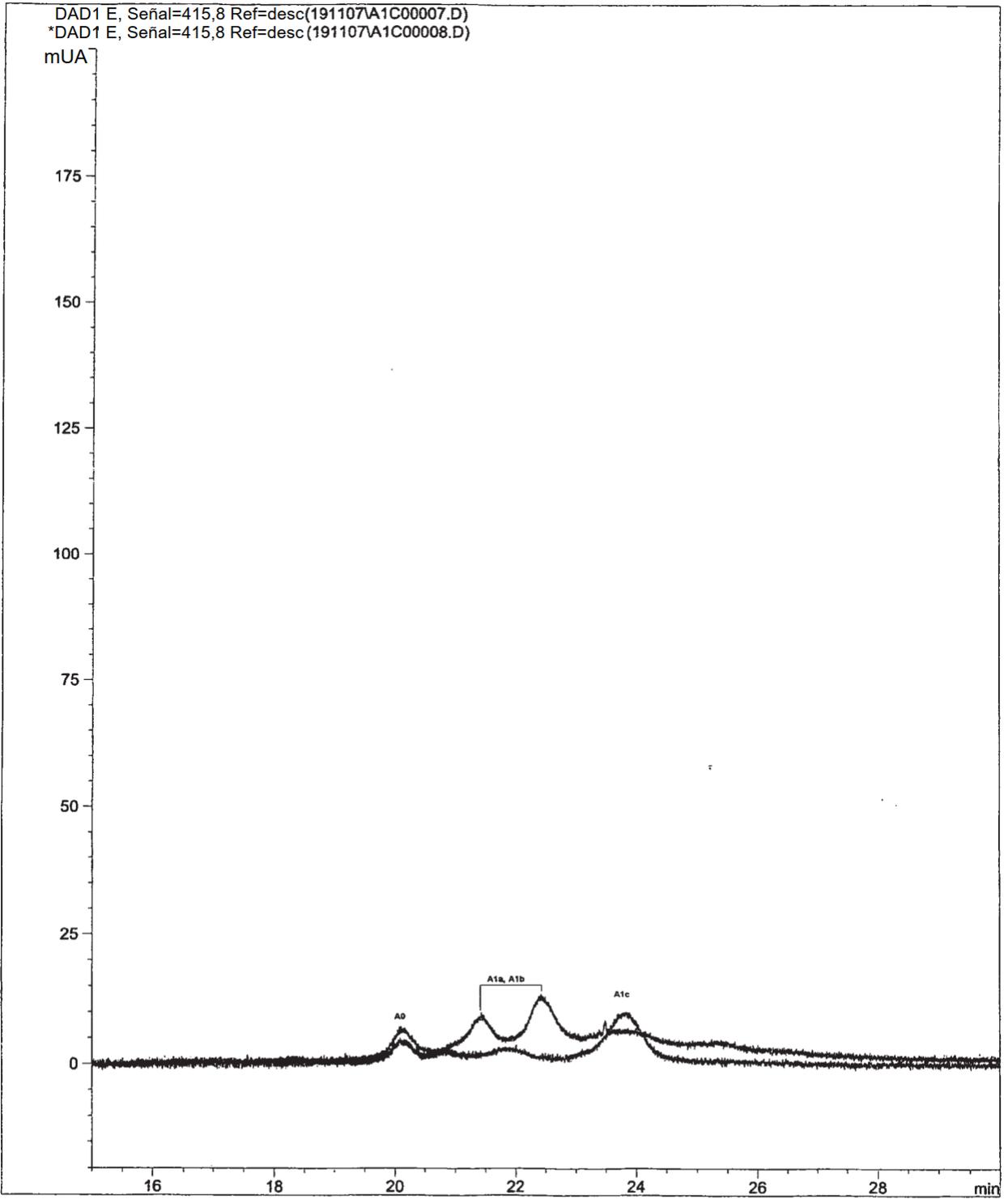


Figura 7

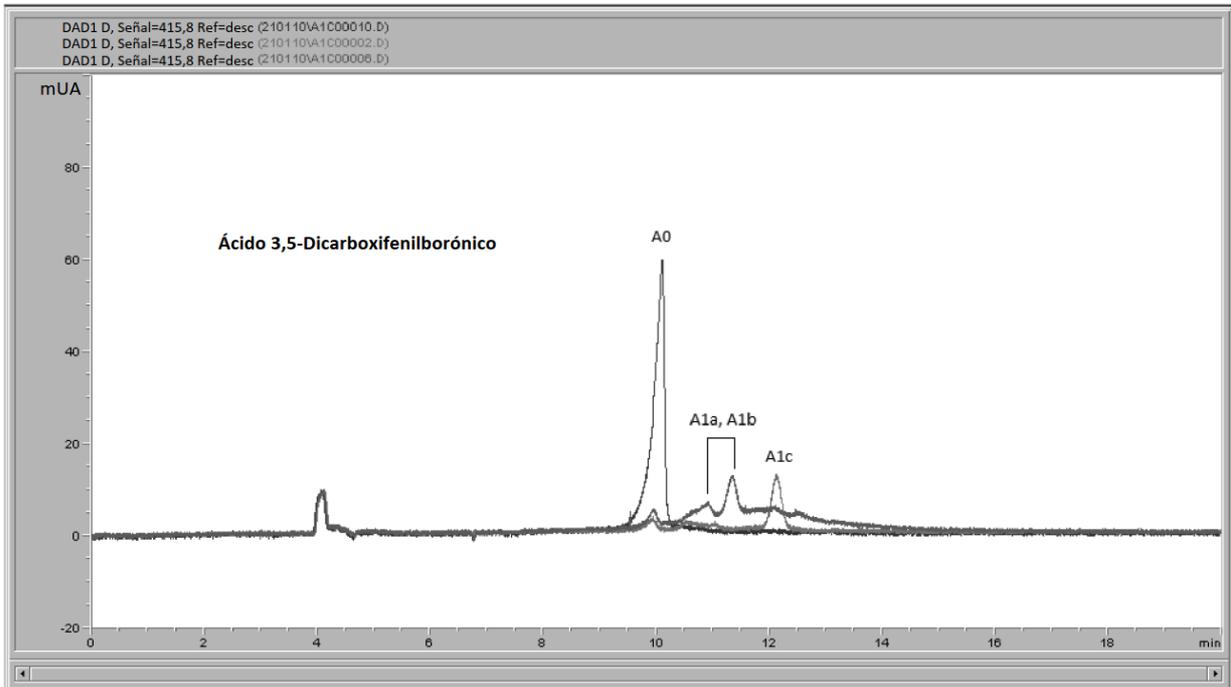


Figura 8

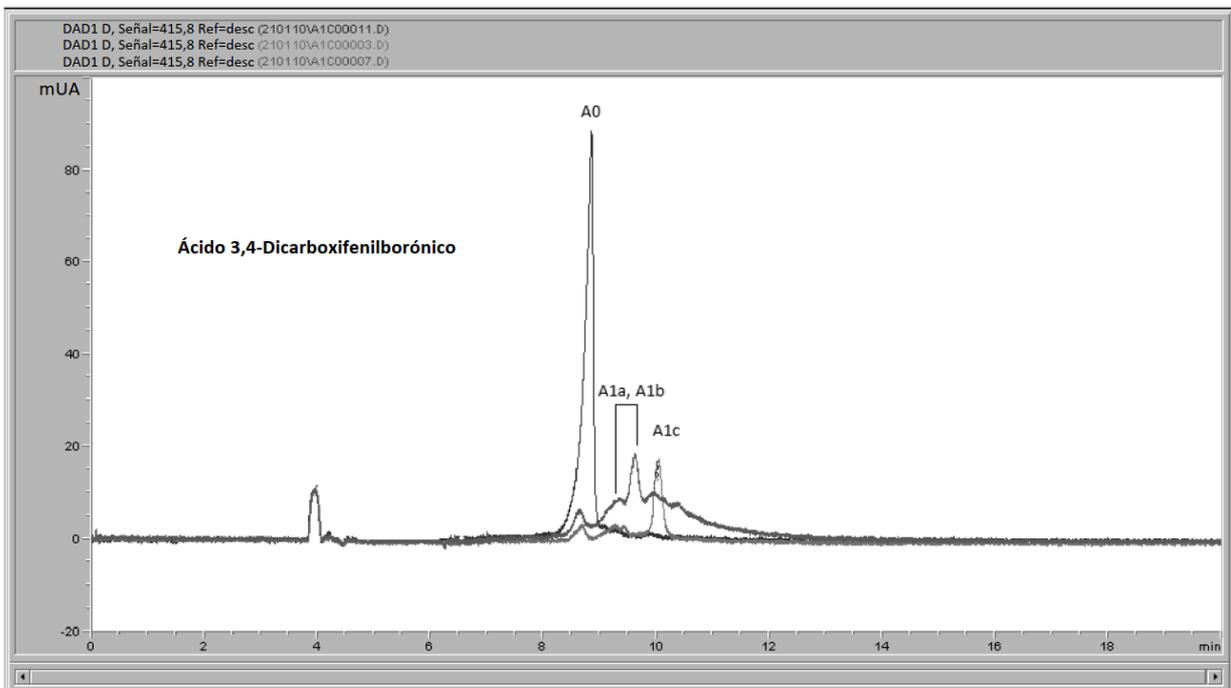


Figura 9

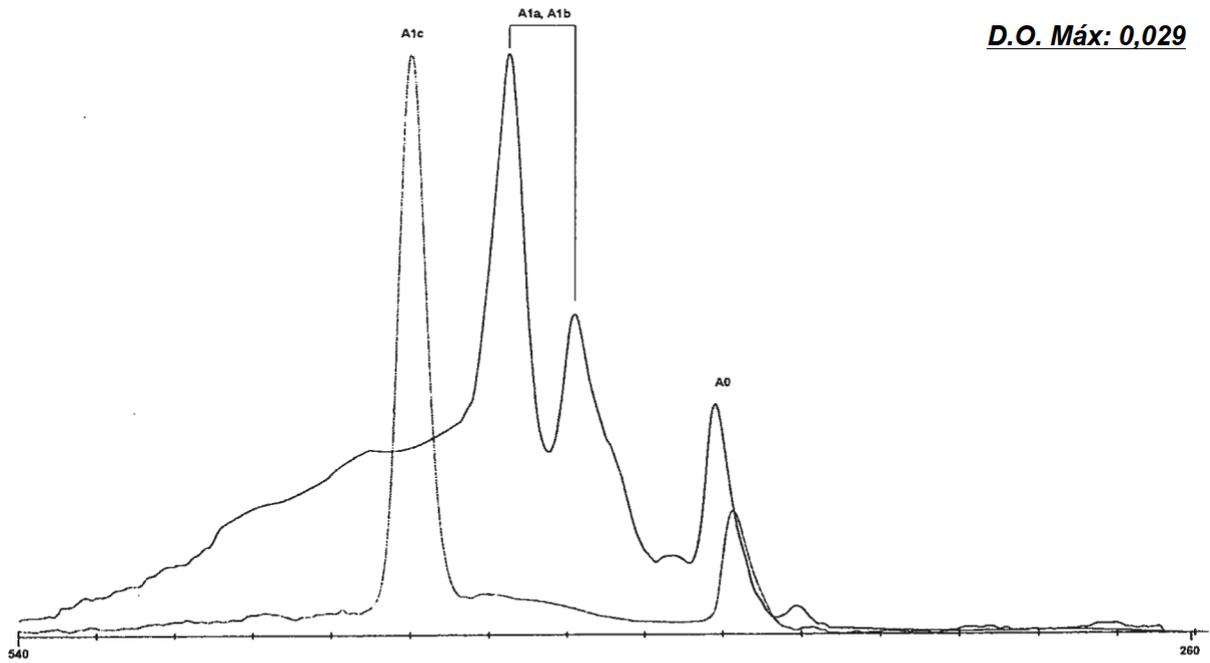


Figura 10

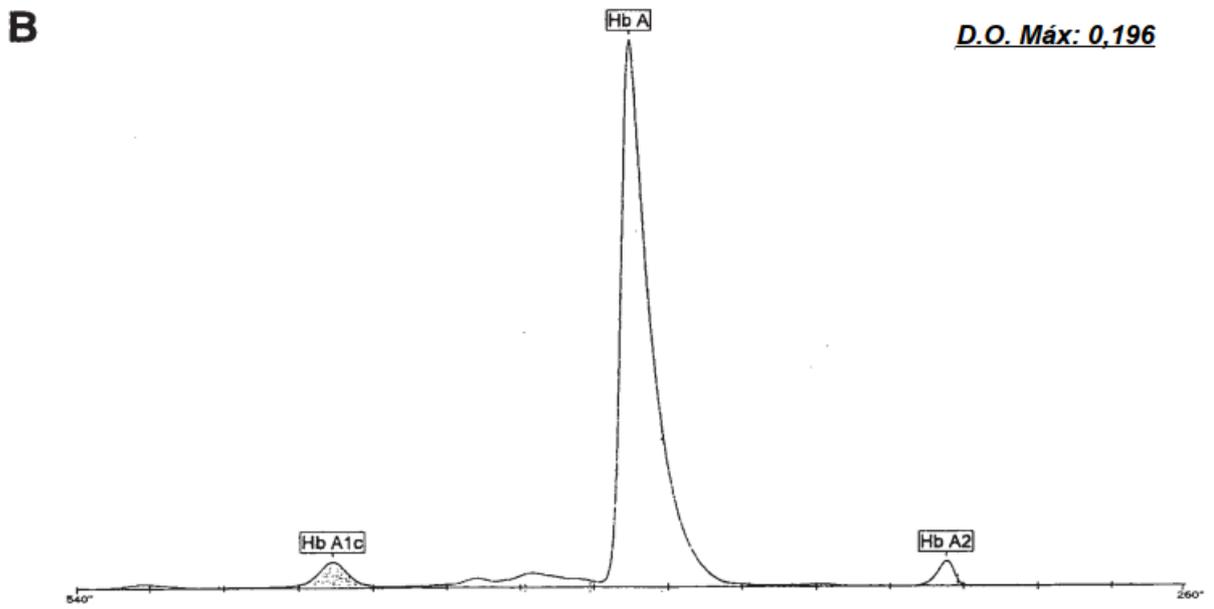
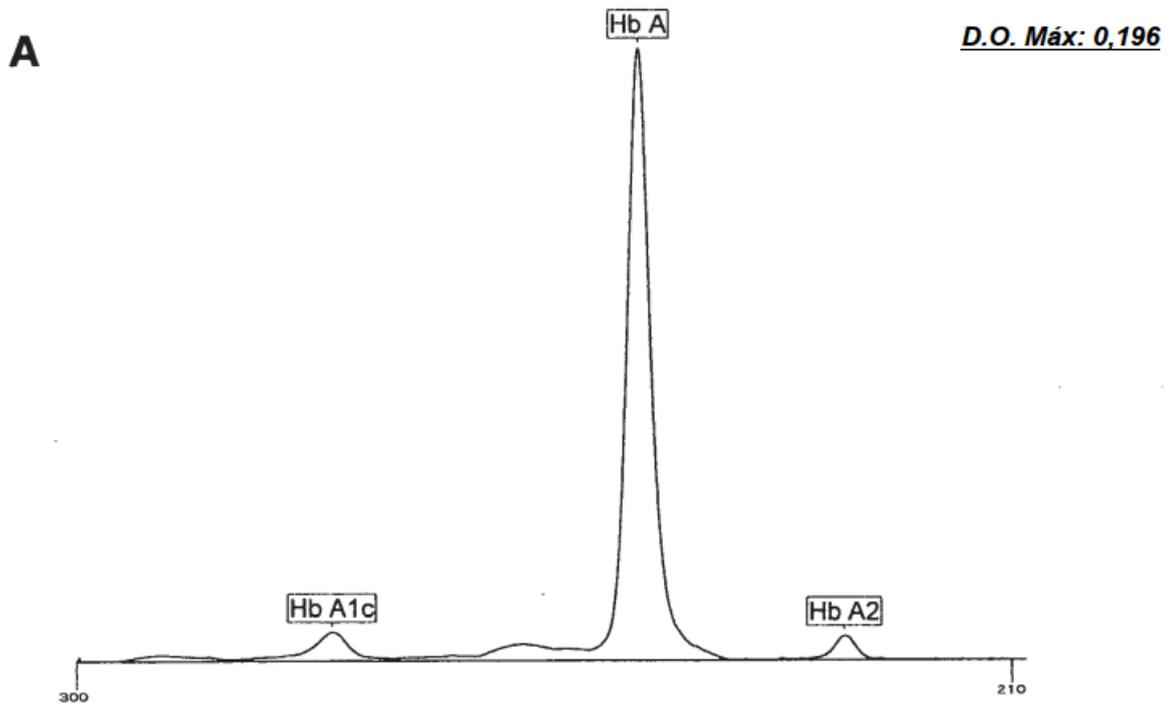


Figura 11

| [3,5-dCPBA] | $\Delta t = t_{A_{1c}} - t_{A_0}$ (min) | $\Delta t/t = [t_{A_{1c}} - t_{A_0}] / t_{A_0}$ | t_{A_0} (min) |
|-------------|--|---|-----------------|
| 0 | 0 | 0 | 18,042 |
| 10 | 0,918 | 0,050 | 18,316 |
| 20 | 1,757 | 0,093 | 18,96 |
| 30 | 2,018 | 0,104 | 19,341 |
| 30 | 1,979 | 0,105 | 18,927 |
| 40 | 2,264 | 0,116 | 19,502 |
| 50 | 2,546 | 0,127 | 19,991 |
| 60 | 2,885 | 0,139 | 20,699 |
| 70 | 3,04 | 0,143 | 21,218 |
| 80 | 3,224 | 0,149 | 21,688 |
| 90 | 3,56 | 0,158 | 22,495 |
| 100 | 3,998 | 0,172 | 23,249 |
| 120 | 4,568 | 0,187 | 24,478 |

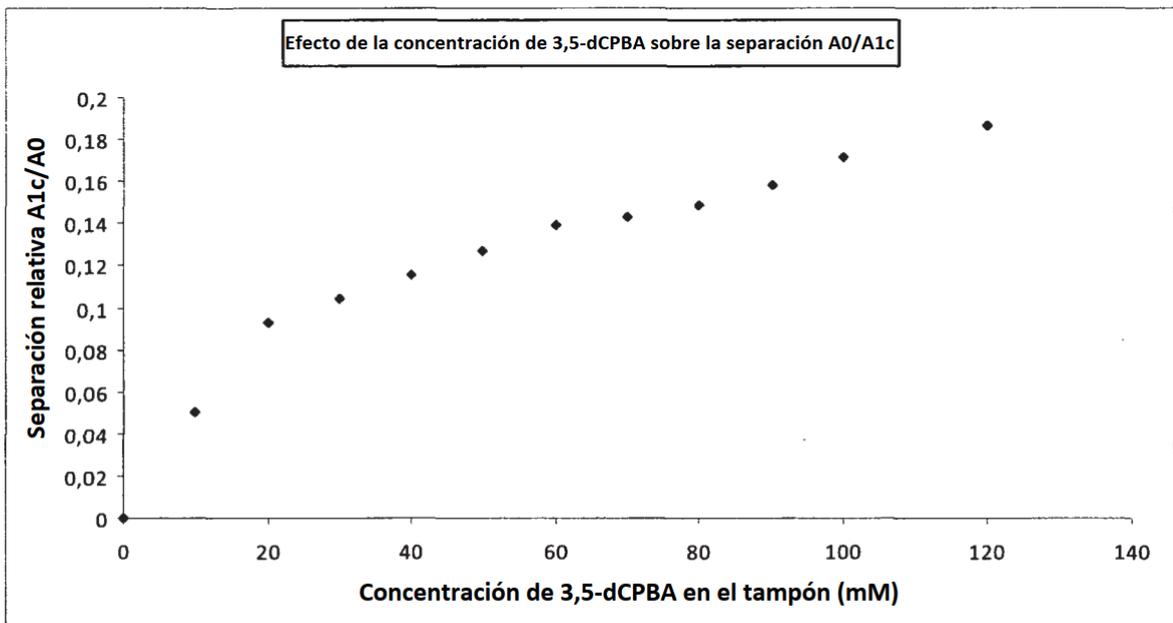


Figura 12

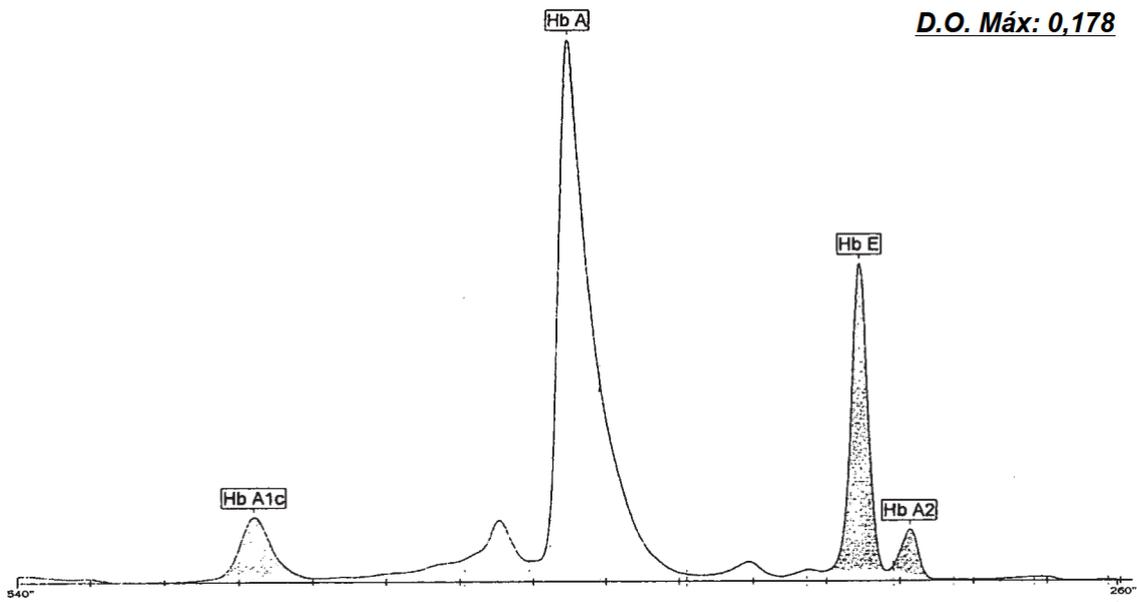


Figura 13

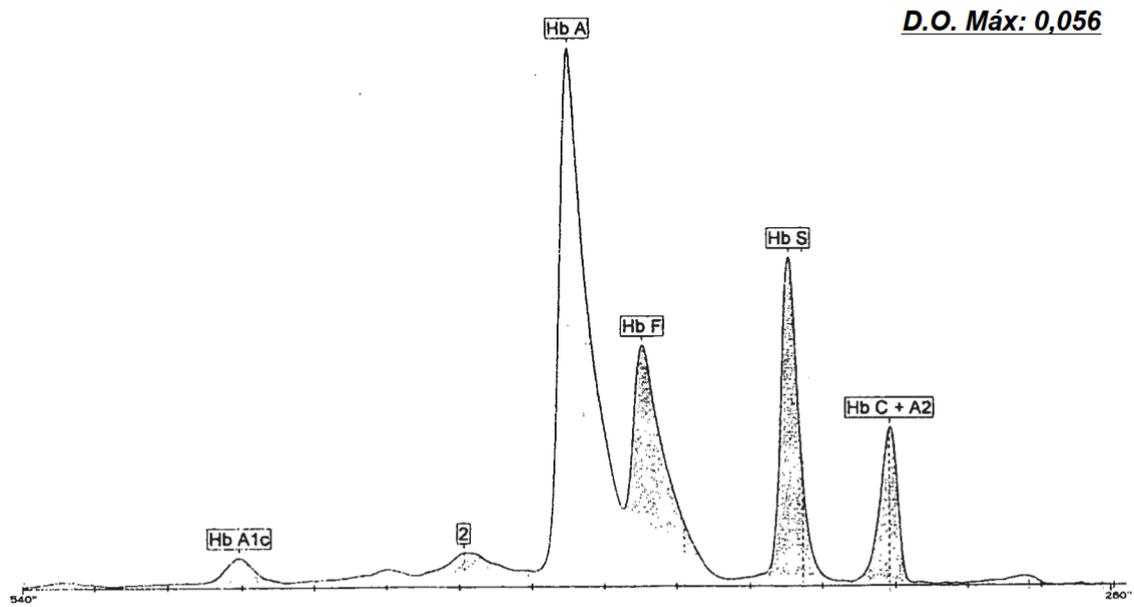


Figura 14

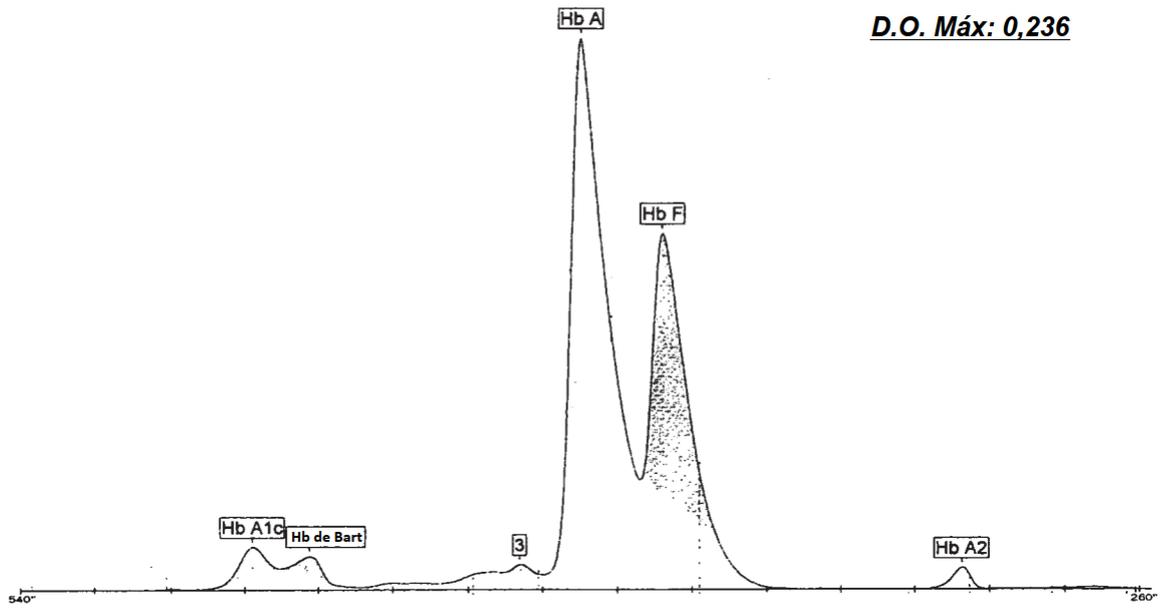


Figura 15

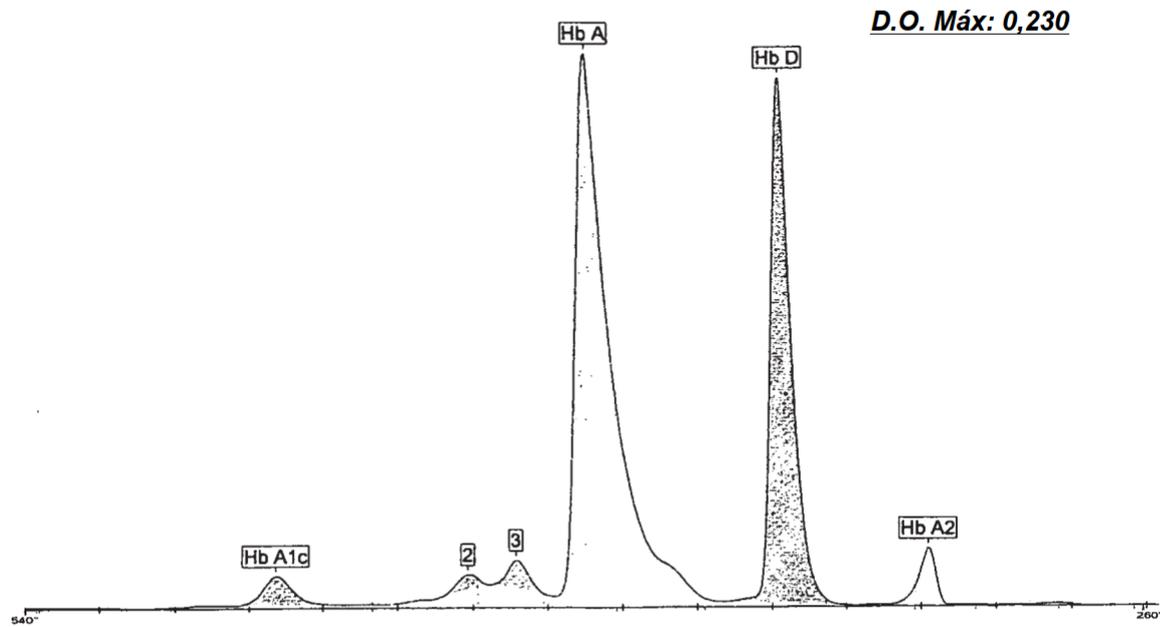


Figura 16

| Muest. | % A _{1c} - HPLC | valores brutos % A _{1c} - EC | valores corregidos %A _{1c} - EC | desvío HPLC – EC corregida |
|--------|--------------------------|---------------------------------------|--|----------------------------|
| 1 | 5,5 | 3,9 | 5,3 | 0,2 |
| 2 | 6,9 | 5,5 | 6,7 | 0,2 |
| 3 | 7,1 | 6,1 | 7,1 | 0,0 |
| 4 | 8,9 | 8,4 | 8,7 | 0,2 |
| 5 | 6,6 | 5,5 | 6,8 | -0,2 |
| 6 | 8,3 | 7,3 | 8,4 | -0,1 |
| 7 | 5,1 | 4,1 | 5,4 | -0,3 |
| 8 | 6,4 | 5,2 | 6,5 | -0,1 |
| 9 | 6,5 | 4,9 | 6,2 | 0,3 |
| 10 | 6,1 | 4,7 | 6,0 | 0,1 |
| 11 | 5,2 | 3,6 | 5,3 | -0,1 |
| 12 | 12,7 | 13,3 | 12,5 | 0,2 |
| 13 | 6,4 | 5,5 | 6,6 | -0,2 |
| 14 | 6,5 | 5,0 | 6,3 | 0,2 |
| 15 | 7,0 | 5,8 | 6,8 | 0,2 |
| 16 | 9,4 | 8,9 | 9,0 | 0,4 |
| 17 | 5,3 | 3,9 | 5,5 | -0,2 |
| 18 | 7,5 | 6,2 | 7,5 | 0,0 |
| 19 | 6,2 | 4,7 | 6,1 | 0,1 |
| 20 | 6,8 | 5,7 | 6,8 | 0,0 |
| 21 | 7,9 | 7,1 | 7,9 | 0,0 |
| 22 | 9,3 | 8,9 | 9,2 | 0,1 |
| 23 | 5,2 | 3,8 | 5,3 | -0,1 |
| 24 | 8,3 | 7,4 | 8,3 | 0,0 |
| 25 | 8,0 | 6,9 | 8,1 | -0,1 |
| 26 | 8,9 | 8,2 | 8,8 | 0,1 |
| 27 | 6,3 | 5,1 | 6,3 | 0,0 |
| 28 | 6,1 | 4,6 | 6,0 | 0,1 |
| 29 | 7,6 | 6,6 | 7,5 | 0,1 |
| 30 | 8,8 | 8,1 | 8,5 | 0,3 |
| 31 | 7,7 | 6,7 | 7,7 | 0,0 |

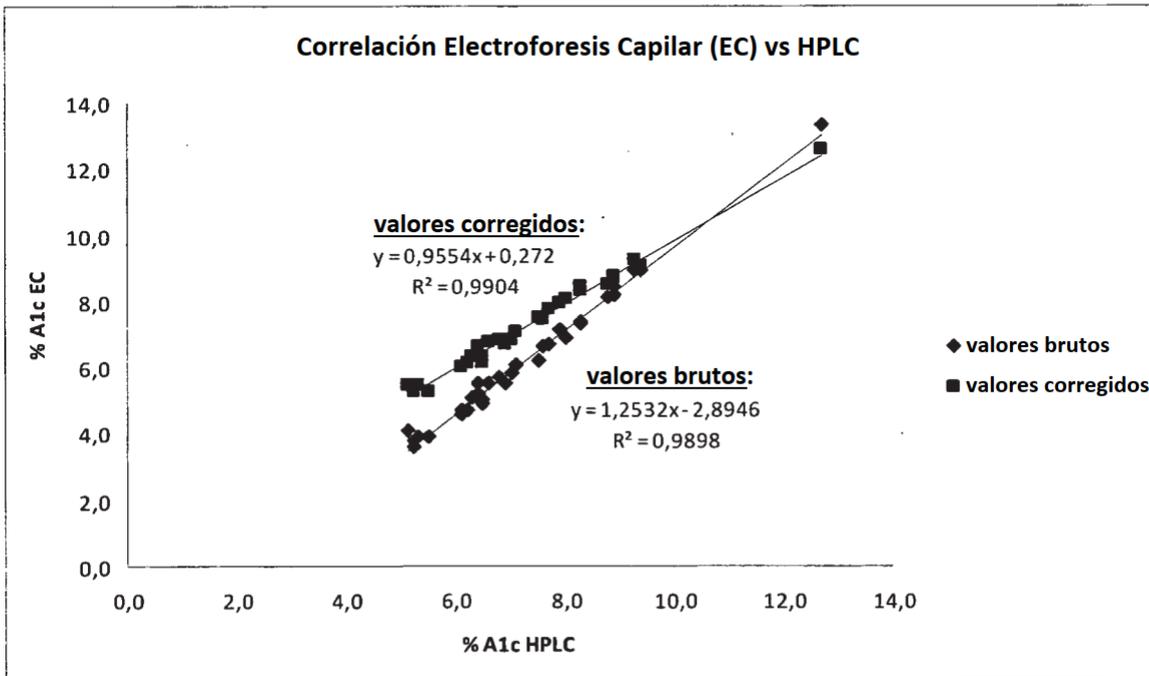


Figura 17

Figura 18A

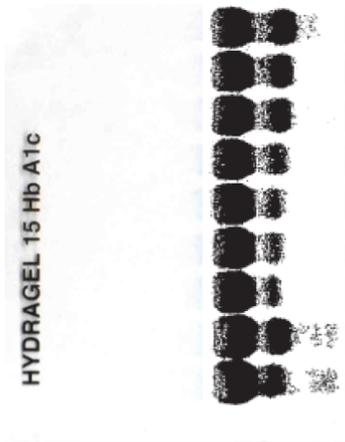
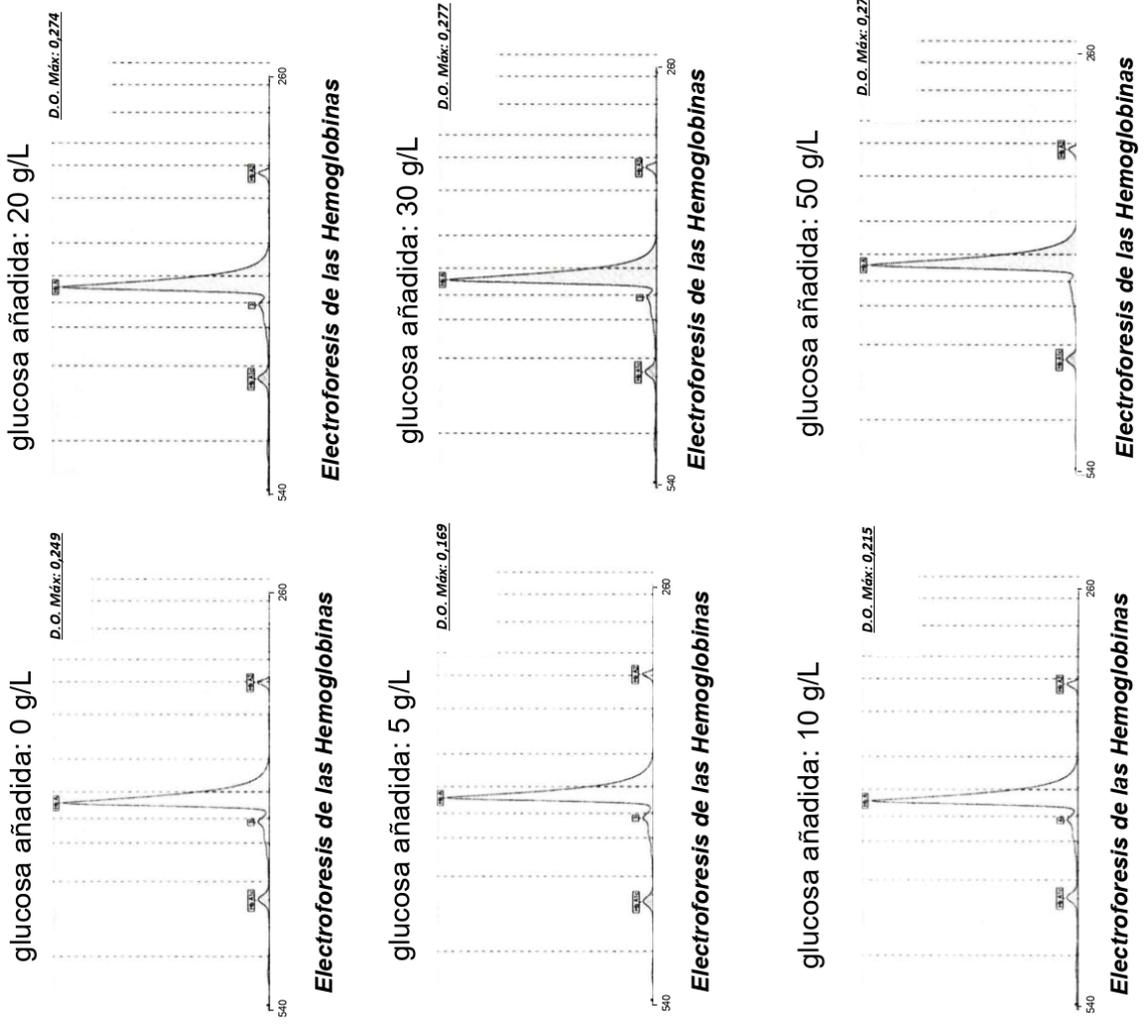


Figura 18B



ES 2 785 723 T3

Figura 18C

| Concentración de glucosa (g/L) | % A1c gel | % A1c EC |
|--------------------------------|-----------|----------|
| 0 (referencia) | 4,1 | 4,2 |
| 1 | 4,5 | - |
| 5 | 4,6 | 4,3 |
| 10 | 5,3 | 4,3 |
| 20 | 7,8 | 4,1 |
| 30 | 8,6 | 4,1 |
| 50 | 14,8 | 4,1 |