

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 551**

51 Int. Cl.:

G01N 33/531 (2006.01)

C07K 14/805 (2006.01)

G01N 1/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2016 PCT/JP2016/060597**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2016 WO16159203**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2016 E 16773083 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3279660**

54 Título: **Solución conservante para hemoproteína, y procedimiento de estabilización de hemoproteína**

30 Prioridad:

31.03.2015 JP 2015070667

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

08.02.2021

73 Titular/es:

**EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)
4-19-9, Taito
Taito-ku, Tokyo 110-8408, JP**

72 Inventor/es:

**SAKATA KOZUE;
SUGO SHIN y
YASUI RYOTA**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 804 551 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

Solución conservante para hemoproteína, y procedimiento de estabilización de hemoproteína

Campo técnico

La presente invención está definida en las reivindicaciones 1 a 15.

5 Técnica anterior

En los últimos años, ha sido ampliamente llevada a cabo una prueba de sangre oculta en heces para la detección de sangre en las heces como prueba primaria para la detección de cáncer de colon o como procedimiento para la detección de una enfermedad gastrointestinal inferior, con la creciente incidencia de cáncer. La prueba de sangre oculta en heces es realizada mediante un procedimiento de medición química basado en una reacción química de coloración que emplea una actividad similar a la peroxidasa de la hemoglobina, que es una hemoproteína, o un procedimiento de inmunoensayo que emplea un anticuerpo específico de hemoglobina antihumano. En particular, el procedimiento de inmunoensayo permite una medición conveniente y rápida sin necesidad de ninguna restricción dietética y ninguna restricción de la toma de fármacos antes de la prueba, en comparación con los procedimientos de medición química, y por lo tanto ha sido establecido como un importante procedimiento de prueba para la prueba de sangre oculta en heces.

Sin embargo, es sabido que la hemoglobina es muy inestable en una solución y resulta desnaturalizada o degradada fácilmente. Tal desnaturalización o degradación destruye la conformación de la hemoglobina, resultando en una disminución de la antigenicidad. Por lo tanto, el procedimiento de inmunoensayo para medir la hemoglobina en tal caso puede producir resultados de medición erróneos. Los ejemplos de razones de la desnaturalización o degradación de la hemoglobina son variados e incluyen el aumento de las temperaturas de almacenamiento, el paso del tiempo, las bacterias y las enzimas. Por ejemplo, con respecto a las temperaturas de almacenamiento es sabido que la hemoglobina en una solución es relativamente estable en estado congelado o refrigerado, pero que a temperatura ambiente o a una temperatura superior a la temperatura ambiente se produce la desnaturalización o degradación de la hemoglobina.

En particular, en un análisis de sangre oculta en heces, a menudo las heces son recolectadas por los propios individuos en sus hogares, y son proporcionadas para pruebas suspendiendo las heces en un recipiente cerrado que contiene un diluyente para las muestras de heces. En tales casos, la hemoglobina humana fecal puede dejarse reposar en solución durante varios días o exponerse a una temperatura elevada durante el transporte a través de un medio de transporte tal como el servicio postal. Además, un hospital o un laboratorio clínico a menudo demorar mucho tiempo en tener los resultados de las mediciones, dado que un gran número de muestras y otros elementos de prueba son probados en dichas instalaciones. En tales circunstancias, la desnaturalización o degradación de la hemoglobina tiende a producirse en un análisis de sangre oculta en heces debido a razones combinadas tal como un aumento de la temperatura y el paso del tiempo.

Además, un análisis de sangre oculta en heces a menudo implica la realización de una medición con un analizador automático capaz de medir numerosas muestras con precisión y rapidez. Una vez realizada la medición con un analizador automático, son realizadas calibraciones periódicas y controles de precisión para el analizador automático utilizando una muestra de referencia que contiene hemoglobina a una concentración conocida y una muestra de control que contiene hemoglobina a una concentración conocida, dado que los cambios en los reactivos y en el analizador afectan a la precisión de los resultados de prueba. La calibración consiste en medir una muestra de referencia que contiene una pluralidad de sustancias objetivo de medición con concentraciones conocidas mediante un analizador automático, preparar una curva de calibración y realizar la calibración para el analizador automático. El control de precisión implica medir una muestra de control que contiene sustancias objetivo de medición con concentraciones conocidas por un analizador automático, y determinar la precisión analítica en función de si el valor de medición está dentro de un intervalo predeterminado. Sin embargo, si la hemoglobina contenida en esa muestra de referencia y en una muestra de control resulta desnaturalizada o degradada, la calibración y el control de precisión no pueden ser realizados con precisión, lo que conduce a una medición errónea.

Por lo tanto, han sido propuestos diversos procedimientos de estabilización de hemoglobina para suprimir la desnaturalización o degradación de la hemoglobina para producir resultados de medición precisos. Los ejemplos de esos procedimientos que han sido propuestos incluyen: un procedimiento que implica añadir agentes antibacterianos tal como timerosal y clorhexidina (por ejemplo, véase la Bibliografía de Patentes 1); un procedimiento que implica añadir hemoglobina de animales no humanos (por ejemplo, véase la Bibliografía de Patentes 2); un procedimiento que implica añadir sueros de animales no humanos (por ejemplo, el suero de un animal no humano), véase la Bibliografía de Patentes 3); un procedimiento que implica añadir una enzima bacteriolítica de tipo glucosidasa (por ejemplo, véase la Bibliografía de Patentes 4); un procedimiento que implica añadir ácido sulfuroso, ácido disulfuroso o similares (por ejemplo, véase la Bibliografía de Patentes 5); un procedimiento que implica añadir ésteres de arginina acídica y tensoactivos catiónicos (por ejemplo, véase la Bibliografía de Patentes 6); y un procedimiento que implica añadir ácido glioxálico (por ejemplo, véase la Bibliografía de Patentes 7).

5 Por lo tanto, el solicitante de la presente invención ya ha propuesto un procedimiento que implica añadir un complejo de metal de transición soluble en agua, tal como un compuesto de ferrociano (por ejemplo, véase la Bibliografía de Patentes 8 y 9), un procedimiento que implica añadir un producto de degradación enzimática de la hemoglobina (por ejemplo, véase la Bibliografía de Patentes 10), un procedimiento que implica añadir metales de transición (por ejemplo, véase la Bibliografía de Patentes 11), un procedimiento que implica añadir ácido orgánico como el ácido málico (por ejemplo, véase la Bibliografía de Patentes 12), un procedimiento que implica añadir albúmina delipidada (por ejemplo, véase la Bibliografía de Patentes 13), y un procedimiento que implica añadir ácido iminocarboxílico (por ejemplo, véase la Bibliografía de Patentes 14), por ejemplo.

10 Sin embargo, la hemoglobina es muy inestable, por lo que incluso estos procedimientos de estabilización de hemoglobina son problemáticos para prevenir la desnaturalización o degradación de la hemoglobina de manera suficiente.

Lista de citas

Bibliografía de Patentes

- 15 Bibliografía de Patentes 1: Publicación de Patente de Japón (Kokai) Núm. 63-271160A (1988)
- Bibliografía de Patentes 2: Publicación de Patente de Japón (Kokai) Núm. 2-296149A (1990)
- Bibliografía de Patentes 3: Publicación de Patente de Japón (Kokai) Núm. 4-145366A (1992)
- Bibliografía de Patentes 4: Publicación de Patente de Japón (Kokoku) No. 5-69466B (1993)
- Bibliografía de Patentes 5: Publicación de Patente de Japón (Kokai) Núm. 2000-258420A
- Bibliografía de Patentes 6: Publicación de patentes JP (Kokai) Núm. 2009-222710A
- 20 Bibliografía de Patentes 7: Publicación de patentes JP (Kokai) Núm. 2013-257216A
- Bibliografía de Patentes 8: Publicación de Patente de Japón (Kokai) Núm. 7-229902A (1995)
- Bibliografía de Patentes 9: Publicación de Patente de Japón (Kokai) Núm. 11-118806A (1999)
- Bibliografía de Patentes 10: Publicación de Patente de Japón (Kokai) Núm. 11-218533A (1999)
- Bibliografía de Patentes 11: Publicación de Patente de Japón (Kokai) Núm. 2001-249132A
- 25 Bibliografía de Patentes 12: Publicación de Patente de Japón (Kokai) Núm. 2003-14768A
- Bibliografía de Patentes 13: Publicación de Patente de Japón (Kokai) Núm. 2003-194825A
- Bibliografía de Patentes 14: Publicación de Patente de Japón (Kokai) Núm. 2009-097956A

Sumario de la invención

Problema técnico

30 Para resolver tales problemas, un objeto de la presente invención es proporcionar una solución conservante novedosa para una hemoproteína y un procedimiento de estabilización de una hemoproteína, que son eficaces contra la desnaturalización o degradación de una hemoproteína representada por la hemoglobina.

Solución del problema

35 La solución conservante de una hemoproteína de la presente invención está caracterizada porque contiene ácido disulfónico o una de sus sales. Además, el procedimiento de estabilización de una hemoproteína de la presente invención está caracterizado por la coexistencia de ácido disulfónico o una de sus sales en una muestra que contiene la hemoproteína.

Específicamente, la presente invención abarca los siguientes puntos (1) a (15).

- 40 (1) Una solución conservante para una hemoproteína, que comprende un ácido disulfónico o una de sus sales, en la que
- el ácido disulfónico o una de sus sales tiene al menos un grupo de hidrocarburos de cadena abierta y un grupo de hidrocarburos cíclicos, y
- el ácido disulfónico o una de sus sales es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en:

- un ácido disulfónico o una de sus sales en el que el grupo de hidrocarburos de cadena abierta es un grupo de hidrocarburos ramificados o lineales y la cadena principal del grupo de hidrocarburos de cadena abierta ramificados o del grupo de hidrocarburos de cadena abierta lineales tiene uno cualquiera de 1 a 10 átomos de carbono; y
- 5 un ácido disulfónico o una de sus sales en el que el grupo de hidrocarburos cíclicos es un grupo cicloalquileo o un grupo arilo y el grupo de hidrocarburos cíclicos tiene uno cualquiera de 3 a 10 átomos de carbono; y en el que la hemoproteína es hemoglobina, mioglobina, peroxidasa, o catalasa.
- 10 (2) La solución conservante de una hemoproteína de acuerdo con el punto (1), en la que el ácido disulfónico consiste en un grupo de hidrocarburos de cadena abierta o cíclicos y dos grupos sulfona.
- (3) La solución conservante de una hemoproteína de acuerdo con el punto (1), en la que el ácido disulfónico tiene un sustituyente y el sustituyente es un grupo halógeno y/o un grupo hidroxilo.
- 15 (4) La solución conservante de una hemoproteína de acuerdo con el punto (1), en la que el ácido disulfónico o una de sus sales es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en ácido metanodisulfónico, ácido etanodisulfónico, ácido propanodisulfónico, ácido butanodisulfónico y ácido naftalenodisulfónico, o una de sus sales.
- (5) La solución conservante para una hemoproteína de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (4), en la que la concentración del ácido disulfónico o de una de sus sales es de 0,001 mol/L o mayor y de 0,3 mol/L o menor.
- 20 (6) La solución conservante de una hemoproteína de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (5), que comprende además el ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-etanosulfónico.
- (7) La solución conservante de una hemoproteína de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (6) que comprende además una hemoproteína, que es utilizada como una muestra de referencia o muestra de control.
- 25 (8) La solución conservante de una hemoproteína de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (1) a (7), que es utilizada para inmunoensayo.
- (9) Un procedimiento de estabilización de una hemoproteína, en el que se hace coexistir un ácido disulfónico o una de sus sales en una muestra que contiene una hemoproteína,
- 30 el ácido disulfónico o una de sus sales tiene al menos un grupo de hidrocarburos de cadena abierta y un grupo de hidrocarburos cíclicos, y
- el ácido disulfónico o una de sus sales es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en:
- 35 un ácido disulfónico o una de sus sales en el que el grupo de hidrocarburos de cadena abierta es un grupo de hidrocarburos ramificados o lineales y la cadena principal del grupo de hidrocarburos de cadena abierta ramificados o del grupo de hidrocarburos de cadena abierta lineales tiene uno cualquiera de 1 a 10 átomos de carbono; y
- un ácido disulfónico o una de sus sales en el que el grupo de hidrocarburos cíclicos es un grupo cicloalquileo o un grupo arilo y el grupo de hidrocarburos cíclicos tiene uno cualquiera de 3 a 10 átomos de carbono; y en el que la hemoproteína es hemoglobina, mioglobina, peroxidasa, o catalasa.
- 40 (10) El procedimiento de estabilización de una hemoproteína de acuerdo con el punto (9), en el que el ácido disulfónico consiste en un grupo de hidrocarburos de cadena abierta o cíclicos y dos grupos sulfona.
- (11) El procedimiento de estabilización de una hemoproteína de acuerdo con el punto (9), en el que el ácido disulfónico tiene un sustituyente y el sustituyente es un grupo halógeno y/o un grupo hidroxilo.
- 45 (12) El procedimiento de estabilización de una hemoproteína de acuerdo con el punto (9), en el que el ácido disulfónico o una de sus sales es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en ácido metanodisulfónico, ácido etanodisulfónico, ácido propanodisulfónico, ácido butanodisulfónico y ácido naftalenodisulfónico, o una de sus sales.
- (13) El procedimiento de estabilización de una hemoproteína de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (9) a (12), en el que el ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-etanosulfónico se hace coexistir en forma adicional en una muestra que comprende dicha hemoproteína.
- 50

(14) El procedimiento de estabilización de una hemoproteína de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (9) a (13), en el que la concentración del ácido disulfónico o de una de sus sales es de 0,001 mol/L o mayor y de 0,3 mol/L o menor.

5 (15) Un procedimiento de inmunoensayo para una hemoproteína, que comprende una etapa para poner en contacto una hemoproteína con un anticuerpo antihemoproteína en presencia de un ácido disulfónico o una de sus sales,

en el que el ácido disulfónico o una de sus sales tiene al menos un grupo de hidrocarburos de cadena abierta y un grupo de hidrocarburos cíclicos, y el ácido disulfónico o una de sus sales es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en:

10 un ácido disulfónico o una de sus sales en el que el grupo de hidrocarburos de cadena abierta es un grupo de hidrocarburos ramificados o lineales y la cadena principal del grupo de hidrocarburos de cadena abierta ramificados o del grupo de hidrocarburos de cadena abierta lineales tiene uno cualquiera de 1 a 10 átomos de carbono; y

15 un ácido disulfónico o una de sus sales en el que el grupo de hidrocarburos cíclicos es un grupo cicloalquileo o un grupo arilo y el grupo de hidrocarburos cíclicos tiene uno cualquiera de 3 a 10 átomos de carbono; y en el que la hemoproteína es hemoglobina, mioglobina, peroxidasa, o catalasa.

Efecto ventajoso de la invención

20 De acuerdo con la solución conservante para una hemoproteína y el procedimiento de estabilización de una hemoproteína de la presente invención, la desnaturalización o degradación de una hemoproteína puede ser suprimida y la hemoproteína puede ser almacenada de manera estable.

Descripción de realizaciones

La presente invención es explicada en detalle a continuación.

25 La solución conservante de una hemoproteína de la presente invención contiene ácido disulfónico o una de sus sales. Además, el procedimiento de estabilización de una hemoproteína de la presente invención hace coexistir un ácido disulfónico o una de sus sales en una muestra que contiene una hemoproteína.

30 El ácido disulfónico o una de sus sales a ser utilizado en la presente invención no están particularmente limitados y pueden ser seleccionados de ejemplos conocidos del mismo. El ácido disulfónico a ser utilizado en la presente invención es ácido disulfónico que tiene al menos un grupo de hidrocarburos de cadena abierta o cíclicos que puede tener un enlace saturado o insaturado, y en particular, el ácido disulfónico es preferentemente ácido disulfónico que consiste en un grupo de hidrocarburos de cadena abierta o cíclicos y dos grupos sulfona. El ácido disulfónico a ser utilizado en la presente invención puede tener cualquiera de un grupo de hidrocarburos de cadena abierta o un grupo de hidrocarburos cíclicos, o ambos de estos grupos.

35 En particular, el grupo de hidrocarburos de cadena abierta del ácido disulfónico a ser utilizado en la presente invención es un grupo de hidrocarburos ramificados o lineales. La cadena principal del grupo de hidrocarburos ramificados o del grupo de hidrocarburos lineales tiene uno cualquiera de preferentemente 1 a 10 y más preferentemente 1 a 4, y aún más preferentemente 1 o 2 átomos de carbono. La cadena principal del grupo de hidrocarburos ramificados o el grupo de hidrocarburos lineales es preferentemente un grupo alquilo, un grupo alqueno, un grupo alquino, un grupo alquileo, un grupo alquenoileno, o un grupo alquinoileno. Los ejemplos del ácido disulfónico que tiene un grupo alquileo incluyen ácido metanodisulfónico, ácido 1,2-etanodisulfónico (en adelante en la presente memoria, denominado 1,2-EDS), ácido 1,3-propanodisulfónico, ácido 1,4-butanodisulfónico, ácido 1,5-pentanodisulfónico, y ácido 1,6-hexanodisulfónico.

45 Además, un grupo de hidrocarburos cíclicos de ácido disulfónico a ser utilizado en la presente invención tiene preferentemente uno cualquiera de 3 a 10 átomos de carbono. El grupo de hidrocarburos cíclicos es preferentemente un grupo cicloalquilo, un grupo cicloalqueno, un grupo cicloalquino, o un grupo arilo. En particular, el grupo arilo es preferentemente un grupo fenileno o un grupo naftilénico. Los ejemplos de ácido disulfónico que tienen un grupo fenileno o un grupo naftaleno incluyen ácido 1,2-bencenodisulfónico, ácido 1,3-bencenodisulfónico, ácido 1,4-bencenodisulfónico, ácido 1,6-naftalenodisulfónico, ácido 2,6-naftalenodisulfónico y ácido 2,7-naftalenodisulfónico.

50 Además, el grupo de hidrocarburos cíclicos puede ser un grupo de hidrocarburos ramificados. Además, el grupo de hidrocarburos cíclicos puede ser sustituido por 1 o más, preferentemente 1 a 3, o más preferentemente 1 a 2 átomos de nitrógeno. Un ejemplo de ácido disulfónico que tiene un grupo de hidrocarburos sustituido con un átomo de nitrógeno es piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico).

Además, más preferentemente, el ácido disulfónico a ser utilizado en la presente invención es ácido disulfónico en el que dos grupos sulfona están unidos a una cadena abierta o a un grupo de hidrocarburos cíclicos. Además, el ácido

disulfónico que tiene un grupo de hidrocarburos de cadena abierta tiene dos grupos sulfona preferentemente en átomos de carbono diferentes de la cadena principal de un grupo de hidrocarburos ramificados o un grupo de hidrocarburos lineales, y más preferentemente en cada de estos extremos. El ácido disulfónico a ser utilizado en la presente invención es preferentemente ácido 1,2-etanodisulfónico (1,2-EDS).

5 Un grupo de hidrocarburos del ácido disulfónico a ser utilizado en la presente invención puede tener un sustituyente tal como un grupo halógeno y/o un grupo hidroxilo. También, en el ácido disulfónico que tiene un grupo de hidrocarburos ramificados, la cadena ramificada preferentemente comprende hidrocarburo. Además, el ácido disulfónico o una de sus sales a ser utilizado en la presente invención es al menos uno o puede ser una mezcla de dos o más del ácido disulfónico o una de sus sales.

10 De acuerdo con la presente invención, una solución conservante o una muestra contiene una hemoproteína y ácido disulfónico o una de sus sales, de manera que puede ser suprimida la desnaturalización o degradación de la hemoproteína. En particular, de acuerdo con la presente invención, el ácido disulfónico contiene ácido etanodisulfónico, de modo que la estabilidad de la hemoproteína puede ser aumentada de manera más significativa. El ácido disulfónico a ser utilizado en la presente invención no afecta negativamente la medición, y es particularmente
15 adecuado para los procedimientos de inmunoensayo que utilizan el ensayo de inmunoaglutinación en látex.

La sal de ácido disulfónico a ser utilizada en la presente invención no está particularmente limitada, y es una sal metálica monovalente, divalente o trivalente de ácido disulfónico. Los ejemplos de dicha sal de ácido disulfónico incluyen una sal metálica alcalina, una sal de amonio, una sal metálica alcalino-térrica, un ferrato y una sal de aluminio. Los ejemplos de un metal alcalino incluyen litio, sodio, potasio, rubidio y cesio. Los ejemplos de un metal alcalino
20 incluyen calcio, estroncio, bario, y radio.

El límite superior de la concentración de ácido disulfónico o de una de sus sales contenido en la solución conservante para una hemoproteína o la muestra que contiene una hemoproteína de la presente invención es de 0,3 mol/L o menor, más preferentemente 0,2 mol/L o menor, y aún más preferentemente 0,15 mol/L o menor, y el límite inferior es de 0,001 mol/L o mayor, más preferentemente 0,005 mol/L o mayor, más preferentemente 0,01 mol/L o mayor, y más
25 preferentemente 0,02 mol/L o mayor. Si la concentración del ácido disulfónico o de una de sus sales es menor que 0,001 mol/L, el efecto de estabilización de la hemoproteína será insuficiente. Por otra parte, la concentración de ácido disulfónico o de una de sus sales mayor que 0,3 mol/l inhibirá la inmunorreacción para afectar más fácilmente la medición, así como no proporcionará el efecto suficiente de estabilización de la hemoproteína.

Una hemoproteína como objetivo de la presente invención y una hemoproteína contenida en una muestra de la presente invención pueden ser seleccionadas adecuadamente de hemoglobina, mioglobina, peroxidasa o catalasa. En particular, una hemoproteína como objetivo de la presente invención y una hemoproteína contenida en una muestra de la presente invención es preferentemente una hemoproteína que es un analito inmunológico, y es más preferentemente hemoglobina humana. En los procedimientos de inmunoensayo, es importante mantener la antigenicidad de un objetivo de detección. Sin embargo, la antigenicidad de una hemoproteína puede ser mantenida
35 de acuerdo con la presente invención, permitiendo una medición más precisa de la hemoproteína. En particular, una hemoproteína como objetivo de la presente invención y una hemoproteína contenida en una muestra de la presente invención pueden ser hemoglobinas en una muestra biológica, de modo que la prevención de resultados de medición erróneos en el diagnóstico de enfermedades como el cáncer de intestino grueso pueda ser esperada. Los ejemplos de hemoglobina incluyen hemoglobina fecal, hemoglobina comercialmente disponible como una muestra de referencia o un control que contiene hemoglobina preparada a partir de eritrocitos, y hemoglobina liofilizada.
40

Además, la solución conservante para una hemoproteína o la muestra que contiene una hemoproteína de la presente invención puede contener una solución en la que pueda ser disuelta una hemoproteína. Tal solución puede ser una solución en la que pueda ser disuelta una hemoproteína y las soluciones tampón son ejemplos de esto. Un tampón a ser utilizado para la preparación de una solución tampón no está particularmente limitado, a condición de que tenga capacidad de tampón, y los ejemplos del mismo incluyen el tampón de Good, tampón de fosfato, tampón de Tris, tampón de glicina, y tampón de borato.
45

Además, los ejemplos del tampón de Good incluyen ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES), tampón de bis(2-hidroxi-etil)iminotris(hidroxi-metil)metano (Bis-Tris), tampón de N-(2-acetamida)iminodiacetato (ADA), tampón de piperazina N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), tampón de ácido N-(2-acetamida)-2-aminoetanosulfónico (ACES), tampón de ácido 3-morfolino-2-hidroxi-propanosulfónico (MOPSO), tampón de ácido N,N-bis(2-hidroxi-etil)-2-aminoetanosulfónico (BES), tampón de ácido 3-morfolino-propanosulfónico (MOPS), tampón de ácido N-[tris(hidroxi-metil)metil]-2-aminoetanosulfónico (TES), tampón de ácido N-(2-hidroxi-etil)piperazina-N'-etanosulfónico (HEPES), tampón de ácido 3-[N,N-bis(2-hidroxi-etil)amino]-2-hidroxi-propanosulfónico (DIPSO), tampón de ácido 2-hidroxi-3-[[N-tris(hidroxi-metil)metil]amino]propanosulfónico (TAPSO), tampón de piperazina-N,N'-bis(ácido 2-hidroxi-propano-3-sulfónico) (POPSO), tampón de N-(2-hidroxi-etil)-N'-(2-hidroxi-3-sulfopropil)piperazina (HEPPSO), tampón de N-(2-hidroxi-etil)-N'-(3-sulfopropil)piperazina (EPPS), tampón de tricina[N-tris(hidroxi-metil)metilglicina], tampón de bicina[N,N-bis(2-hidroxi-etil)glicina], tampón de ácido 3-[N-tris(hidroxi-metil)metil]aminopropanosulfónico (TAPS), tampón de ácido 2-(N-ciclohexilamino)etanosulfónico (CHES), tampón de ácido 3-(N-ciclohexilamino)-2-hidroxi-propanosulfónico (CAPSO) y tampón de ácido 3-(N-ciclohexilamino)propanosulfónico (CAPS). Particularmente,
50 en la presente invención, entre los ejemplos del tampón de Good, preferentemente es utilizado HEPES, la estabilidad
55
60

de una hemoproteína puede ser mejorada significativamente poniendo un ácido disulfónico o una de sus sales en coexistencia con la hemoproteína.

La concentración del tampón no está particularmente limitada, a condición de que sea adecuada para la medición, y oscila de 0,001 y 2,0 mol/L, preferentemente de 0,005 a 1,5 mol/L, y aún más preferentemente de 0,01 a 1,0 mol/L.

- 5 Además, el pH de la solución conservante para una hemoproteína o la muestra que contiene una hemoproteína de la presente invención está preferentemente dentro de un intervalo neutro, preferiblemente que oscila de 5 a 10, y más preferentemente dentro de un intervalo de 6 a 8. El pH menor que 5, o el pH mayor que 10 resulta en un deterioro de la estabilidad de la hemoproteína, de modo que la hemoproteína será fácilmente desnaturalizada o degradada. El pH puede ser ajustado por procedimientos conocidos y también puede ser ajustado usando NaOH o un tampón adecuado.
- 10 Además, la solución conservante de una hemoproteína o la muestra que contiene una hemoproteína de la presente invención puede contener un agente conocido de protección de proteína, tal como un complejo de metal de transición soluble en agua, un compuesto de ferrociano, un producto de degradación enzimática de hemoglobina, metales de transición, ácido orgánico, ácido iminocarboxílico, proteínas inactivas representadas por albúmina y gelatina, y azida de sodio. La solución o la muestra también pueden contener un agente antimicrobiano, por ejemplo, para prevenir la proliferación microbiana innecesaria. La solución o la muestra pueden contener además una sal, un agente acelerador de la agregación y otros componentes, si es necesario, a menos que los efectos ventajosos de la invención resulten perturbados. De acuerdo con la presente invención, la estabilidad de una hemoproteína puede ser mejorada por la presente invención en cooperación con un agente de protección de proteína convencional, un agente antimicrobiano, o similar sin inhibir la acción del agente de protección de proteína convencional, el agente antimicrobiano, o similares.
- 15
- 20 Además, cuando la solución conservante de una hemoproteína o la muestra que contiene una hemoproteína de la presente invención contiene albúmina, puede ser utilizada albúmina, albúmina bovina, albúmina equina, albúmina porcina, albúmina ovina, albúmina de conejo, albúmina humana, albúmina de rata o similares, y también puede ser utilizado un suero que contenga albúmina. La concentración de albúmina en la solución conservante para una hemoproteína o la muestra que contiene una hemoproteína de la presente invención oscila de 0,0005 a 2,0 % p/v, y
- 25 más preferentemente oscila de 0,01 a 0,5 % p/v.

- Un procedimiento de medición de una hemoproteína no está particularmente limitado, y es un procedimiento de inmunoensayo que utiliza un anticuerpo antihemoproteína (anticuerpo que se une específicamente a una hemoproteína), y es preferentemente un procedimiento de inmunoensayo que utiliza un anticuerpo de hemoglobina antihumano. Específicamente, dicho procedimiento implica, en una muestra, poner en contacto una hemoproteína (por ejemplo, hemoglobina humana) con un anticuerpo antihemoproteína (por ejemplo, anticuerpo de la hemoglobina antihumano) en presencia de ácido disulfónico o una de sus sales, causando una reacción antígeno-anticuerpo, y detectar o medir una hemoproteína en la muestra basada en el inmunocomplejo resultante. Cuando una hemoproteína es hemoglobina humana, los ejemplos de procedimientos de inmunoensayo para hemoglobina humana incluyen:
- 30 inmunodifusión radial única que implica confirmar la expresión de una línea de precipitina por un inmunocomplejo formado por la unión de un anticuerpo de hemoglobina antihumano y hemoglobina humana en una muestra de prueba en una placa de agar; un ensayo de inmunoaglutinación en látex que utiliza partículas de látex sensibilizadas con un anticuerpo de hemoglobina antihumano; un inmunoensayo enzimático o un radioinmunoensayo que utiliza un anticuerpo de hemoglobina antihumano marcado con una enzima o un elemento radiactivo; un procedimiento colorimétrico de aglutinación de coloides de oro utilizando partículas de coloides de oro sensibilizadas con un anticuerpo de hemoglobina antihumano; y una inmunocromatografía utilizando un anticuerpo de hemoglobina antihumano etiquetado con un coloide metálico o similar y un anticuerpo de captura para capturar un inmunocomplejo del anticuerpo de hemoglobina antihumano y hemoglobina humana en una membrana tal como una membrana de nitrocelulosa. Específicamente, el ensayo de inmunoaglutinación en látex implica hacer reaccionar partículas de látex sensibilizadas con un anticuerpo de hemoglobina antihumano con hemoglobina humana en una muestra, y medir la hemoglobina humana basada en los cambios en la turbiedad resultantes de la aglutinación en látex debido a la formación de un inmunocomplejo. Además, la inmunocromatografía implica, en una membrana tal como una membrana de nitrocelulosa, suministrar una muestra, hacer reaccionar la hemoglobina humana en la muestra con un anticuerpo de hemoglobina antihumano en una parte de retención de reactivo de etiquetado para retener el anticuerpo de hemoglobina antihumano etiquetado con un coloide de metal o similares, de manera que sea formado un inmunocomplejo, hacer que este se mueva dentro de la membrana mediante un fenómeno capilar, hacer que el inmunocomplejo sea capturado por un anticuerpo de captura inmovilizado en una posición predeterminada de la membrana, y detectar la hemoglobina humana en base a la coloración resultante de la captura. Mediante el uso de la solución conservante para una hemoproteína o la muestra que contiene una hemoproteína de la presente invención que contiene ácido disulfónico o una de sus sales, cualquiera de estos procedimientos de medición puede proteger la actividad antigénica de una hemoproteína y suprimir los errores en los resultados de la medición.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55

- La solución conservante para una hemoproteína de la presente invención puede ser utilizada como una solución para almacenar una hemoproteína en diversas aplicaciones. Por ejemplo, la solución puede ser utilizada como una solución para disolver una hemoproteína derivada de una muestra biológica tal como heces, orina y sangre, o una solución como un diluyente y una solución de extracto. En particular, la solución es útil como diluyente para las muestras de heces en una prueba para la detección de una hemoproteína, tal como una prueba de sangre oculta en heces.
- 60

Además, la solución conservante para una hemoproteína de la presente invención puede contener una hemoproteína como objetivo de la presente invención mencionado con anterioridad, y puede ser utilizada como diversas soluciones que contienen hemoproteínas. De manera similar, el procedimiento de estabilización de una hemoproteína de la presente invención puede ser aplicado a diversas muestras que contengan hemoproteínas. Por ejemplo, la solución conservante para una hemoproteína y la muestra que contiene una hemoproteína de la presente invención pueden ser utilizadas como una muestra de referencia que contiene una hemoproteína, una muestra de control que contiene una hemoproteína, y similares, y particularmente como una muestra de referencia que contiene una hemoproteína o una muestra de control que contiene la misma a ser utilizada para la calibración o el control de precisión para un analizador automático. Incluso cuando una muestra de referencia y una muestra de control que contiene hemoproteínas son almacenadas durante un largo período de tiempo, es necesario que los valores de medición resultantes de las hemoproteínas permanezcan inalterados. De acuerdo con la presente invención, la desnaturalización o degradación de las hemoproteínas en una muestra de referencia y una muestra de control puede ser suprimida, incluso cuando las muestras son almacenadas a una temperatura relativamente alta, de modo que la invención pueda contribuir a la estabilización de los valores de medición de las hemoproteínas. Por lo tanto, la solución conservante para una hemoproteína y la muestra que contiene una hemoproteína de la presente invención son adecuadas como una muestra de referencia y como una muestra de control que contiene hemoproteínas.

Además, es desvelado que la solución conservante para una hemoproteína de la presente invención puede ser proporcionada como un kit para inmunoensayo de hemoproteínas (por ejemplo, hemoglobina humana), que es utilizado para un análisis de sangre oculta en heces, por ejemplo. Este kit puede contener, además de la solución conservante para una hemoproteína de la presente invención, un recipiente de almacenamiento de muestras tal como un recipiente de recolección de heces y un manual de instrucciones para el kit, y, cuando un procedimiento de inmunoensayo es un ensayo de inmunoaglutinación en látex, una solución de látex sensibilizada con un anticuerpo antihemoproteína, un diluyente y similares, o cuando un procedimiento de inmunoensayo es inmunocromatografía, un dispositivo de inmunocromatografía (por ej., membrana, tal como membrana de nitrocelulosa soportada por un soporte que tiene una parte de suministro de muestras, una parte de retención de reactivo de etiquetado para retener un anticuerpo antihemoproteína etiquetado con un coloide metálico o similares, y una parte de detección que contiene un anticuerpo de captura inmovilizado en una posición predeterminada), y similares.

A continuación, la presente invención es descrita específicamente por referencia a ejemplos, pero la presente invención no está limitada a estos ejemplos.

30 Ejemplos

Ejemplo 1

Fue preparada una solución (pH 7,0) que contenía 0,3 % p/v de albúmina de suero bovino, NaOH, una solución tampón de fosfato de 0,05 mol/L como solución tampón y agua pura como resto. Fue añadido 1,2-EDS como aditivo a la solución en una cantidad para dar cada concentración (0,01 a 0,2 mol/L) enumerada en la Tabla 1, preparando así una solución a cada concentración. Fue añadida hemoglobina hemolítica a 10 ml de las soluciones preparadas en una cantidad tal para dar una muestra de 600 ng/ml.

Inmediatamente después de la adición de hemoglobina, fue medida la concentración de hemoglobina (concentración inmediatamente después de la adición) de cada muestra. Posteriormente, cada muestra fue almacenada a 37°C. Con el tiempo de adición de hemoglobina designado como hora 0 de almacenamiento, fue medida la concentración de hemoglobina de cada muestra después de 6 horas de almacenamiento y después de 24 horas de almacenamiento (concentración después de 6 horas de almacenamiento y concentración después de 24 horas de almacenamiento).

La concentración de hemoglobina fue medida utilizando un analizador OC sensor DIANA (Eiken Chemical Co., Ltd) y un reactivo dedicado (OC-Hemodia Auto III: Eiken Chemical Co., Ltd) basado en el principio de medición, una reacción de aglutinación en látex; es decir, un tipo de procedimiento de inmunoensayo. Específicamente, fueron recolectados 35 µL de la muestra y utilizados como una solución de prueba, y luego fueron añadidos a la solución de prueba 60 µL de látex (solución de látex sensibilizada con 20 % de anticuerpo policlonal de conejo de hemoglobina antihumano) y 300 µL de diluyente (11,92 mg/ml de HEPES), seguido por la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm. En base a una curva de calibración elaborada previamente, la concentración de hemoglobina en la solución de prueba fue determinada a partir del valor de medición así obtenido. La medición fue realizada por triplicado para cada muestra, el valor de media de los resultados de la medición fue empleado como la concentración de hemoglobina de cada muestra.

A partir de las concentraciones de hemoglobina así medidas, los porcentajes residuales de hemoglobina fueron hallados en base a la siguiente fórmula.

Porcentaje residual [%] de hemoglobina después de 6 horas de almacenamiento o después de 24 horas de almacenamiento = $100 \times \frac{\text{concentración de hemoglobina [ng/ml] después de 6 horas de almacenamiento o después de 24 horas de almacenamiento}}{\text{concentración [ng/ml] inmediatamente después de la adición en la muestra de control}}$

5 Específicamente, el porcentaje residual de hemoglobina de cada muestra es un valor relativo con la concentración de hemoglobina (inmediatamente después de la adición) en una muestra de control designada como 100%. La muestra de control en este ejemplo era una solución tampón de fosfato (que no contenía 1,2-EDS) que contenía albúmina de suero bovino y NaOH, y la concentración inmediatamente después de la adición en la muestra de control era de 583 ng/ml. Los resultados son mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1

Solución tampón	Aditivo	Concentración de aditivos [mM]	Porcentaje residual [%]	
			Después de 6 horas de almacenamiento	Después de 24 horas de almacenamiento
Ácido fosfórico (control)	Ninguno	0	49,4	7,1
Ácido fosfórico	1,2-EDS	10	52,5	7,5
Ácido fosfórico	1,2-EDS	20	56,3	9,0
Ácido fosfórico	1,2-EDS	40	61,9	12,8
Ácido fosfórico	1,2-EDS	60	59,7	12,3
Ácido fosfórico	1,2-EDS	100	65,4	16,6
Ácido fosfórico	1,2-EDS	150	71,5	24,3
Ácido fosfórico	1,2-EDS	200	46,2	7,9

(Nota) El porcentaje residual es un valor relativo con la concentración inmediatamente después de la adición (583 ng/ml) en una muestra de control designada como 100%.

10 Como es mostrado en la Tabla 1, las muestras que contenían el ácido disulfónico, 1,2-EDS, presentaban porcentajes residuales después de 6 horas de almacenamiento y después de 24 horas de almacenamiento superiores a los de la muestra de control, lo que indica que 1,2-EDS tuvo el efecto de estabilización de hemoglobina. Además, ha sido hallado que los porcentajes residuales eran más altos al añadir la concentración en aumento de 1,2-EDS, lo que indica que la concentración en aumento de 1,2-EDS potenció el efecto de estabilización de hemoglobina.

Ejemplo 2

15 Fueron preparadas muestras de manera similar al Ejemplo 1, excepto que han sido utilizados 0,05 mol/L de ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-etanosulfónico (en adelante en la presente memoria, denominado HEPES) en lugar de una solución tampón de fosfato y que ha sido añadido 1,2-EDS en una cantidad tal para dar cada concentración (0,005 a 0,2 mol/L) enumerada en la Tabla 2, y luego fueron medidas las concentraciones de hemoglobina. Los resultados son mostrados en la Tabla 2. Además, el porcentaje residual de cada muestra fue representada por un valor relativo con la concentración inmediatamente después de la adición (576 ng/ml) en una muestra de control (solución tampón HEPES (que no contenía 1,2-EDS) que contenía albúmina de suero bovino y NaOH) designada como 100%.

20

Tabla 2

Solución tampón	Aditivo	Concentración de aditivos [mM]	Porcentaje residual [%]	
			Después de 6 horas de almacenamiento	Después de 24 horas de almacenamiento
HEPES (control)	Ninguno	0	61,8	11,9
HEPES	1,2-EDS	5	64,3	14,0
HEPES	1,2-EDS	10	65,2	16,6
HEPES	1,2-EDS	20	67,1	18,1
HEPES	1,2-EDS	40	68,5	19,7
HEPES	1,2-EDS	60	71,3	20,8
HEPES	1,2-EDS	100	72,4	21,6
HEPES	1,2-EDS	150	72,8	20,4
HEPES	1,2-EDS	200	73,1	21,8

(Nota) El porcentaje residual es un valor relativo con la concentración inmediatamente después de la adición (576 ng/ml) en una muestra de control designada como 100%.

5 Como es mostrado en la Tabla 2, las muestras que contenían el ácido disulfónico, 1,2-EDS, presentaban porcentajes residuales después de 6 horas de almacenamiento y después de 24 horas de almacenamiento superiores a los de la muestra de control, lo que indica que 1,2-EDS tuvo el efecto de estabilización de hemoglobina. En particular, debido a que contenía HEPES y 1,2-EDS, incluso una muestra con una concentración de 1,2-EDS añadida de tan sólo 5 mM presentaba un alto porcentaje residual después de 6 horas de almacenamiento y después de 24 horas de almacenamiento. Además, ha sido hallado un porcentaje residual más alto al añadir la concentración en aumento de 1,2-EDS, lo que indica que el aumento de la concentración de 1,2-EDS potenció el efecto de estabilización de hemoglobina.

Ejemplo 3

15 Fueron preparadas muestras de manera similar al Ejemplo 1, excepto que fueron añadidos 0,05 mol/L de HEPES, 0,05 mol/L de piperazina-N,N'-bis(2-ácido metansulfónico) (en adelante en la presente memoria, denominado PIPES) o 0,05 mol/L de ácido 2-morfolinoetanosulfónico (en adelante en la presente memoria, denominado MES) en lugar de una solución tampón de fosfato, y que fue añadido 1,2-EDS en una cantidad tal para dar cada concentración enumerada en la Tabla 3, y luego fueron medidas las concentraciones de hemoglobina. Los resultados son mostrados en la Tabla 3. Además, el porcentaje residual de cada muestra fue representado por un valor relativo con la concentración inmediatamente después de la adición (583 ng/ml) en una muestra de control (solución tampón de fosfato (que no contenía 1,2-EDS) que contenía albúmina de suero bovino y NaOH) designada como 100%.

20

Tabla 3

Solución tampón	Aditivo	Concentración de aditivos [mM]	Porcentaje residual [%]	
			Después de 6 horas de almacenamiento	Después de 24 horas de almacenamiento
Ácido fosfórico (control)	Ninguno	0	49,4	7,1
Ácido fosfórico	1,2-EDS	20	56,3	9,0
HEPES	Ninguno	0	46,3	9,3
HEPES	1,2-EDS	20	67,6	20,2
PIPES	Ninguno	0	50,4	9,2
PIPES	1,2-EDS	20	63,6	14,3
MES	Ninguno	0	54,6	11,7
MES	1,2-EDS	20	65,9	18,7

(Nota) El porcentaje residual es un valor relativo con la concentración inmediatamente después de la adición (583 ng/ml) en una muestra de control designada como 100%.

Como es mostrado en la Tabla 3, el efecto de estabilización de hemoglobina exhibida por 1,2-EDS fue confirmado también en muestras que contenían diferentes soluciones tampón. En particular, las muestras que contenían HEPES y 1,2-EDS mostraron porcentajes residuales después de 6 horas de almacenamiento y después de 24 horas de almacenamiento significativamente más altos que los de una muestra que contenía HEPES como solución tampón pero que no contenía 1,2-EDS, lo que indica que las muestras que contenían HEPES y 1,2-EDS tenían un efecto extremadamente alto de supresión de la desnaturalización o degradación de hemoglobina, así como sugiere que la misma puede estabilizar la hemoglobina a largo plazo. Además, una muestra que contenía HEPES y 1,2-EDS presentaba porcentajes residuales después de 6 horas de almacenamiento y después de 24 horas de almacenamiento superiores a los de una muestra que contenía tampón de Good (PIPES o MES) y 1,2-EDS, y fue comprobado que tenía un efecto más elevado de supresión de la desnaturalización o degradación de la hemoglobina, lo que indica que tenía un efecto sinérgico de estabilización de hemoglobina.

Ejemplo 4

Fueron preparadas muestras de manera similar al Ejemplo 1, excepto que fueron añadidos ácido 1,4-butanodisulfónico (en adelante en la presente memoria, denominado 1,4-BDS), ácido 2,6-naftalenodisulfónico (en adelante en la presente memoria, denominado 2,6-NDS) o PIPES, en lugar de 1,2-EDS, en una cantidad tal para dar cada una de las concentraciones enumeradas en la Tabla 4, y que fueron utilizados 0,05 mol/L de HEPES en lugar de una solución tampón de fosfato, y luego fueron medidas las concentraciones de hemoglobina. Los resultados son mostrados en la Tabla 4. Además, el porcentaje residual de cada muestra fue representado por un valor relativo con la concentración inmediatamente después de la adición (548 ng/ml) en una muestra de control (solución tampón de fosfato (que no contenía ácido disulfónico) que contenía albúmina de suero bovino y NaOH) designada como 100%.

Tabla 4

Solución tampón	Aditivo	Concentración de aditivos [mM]	Porcentaje residual [%]	
			Después de 6 horas de almacenamiento	Después de 24 horas de almacenamiento
Ácido fosfórico (control)	Ninguno	0	49,8	6,2
Ácido fosfórico	1,4-BDS	50	68,3	14,5
Ácido fosfórico	1,4-BDS	150	69,9	18,4
Ácido fosfórico	2,6-NDS	50	55,7	11,1
Ácido fosfórico	PIPES	50	58,4	10,4
HEPES	Ninguno	0	64,9	12,5
HEPES	1,4-BDS	150	74,7	28,4

(Nota) El porcentaje residual es un valor relativo con la concentración inmediatamente después de la adición (548 ng/ml) en una muestra de control designada como 100%.

Como es mostrado en la Tabla 4, fue hallado que el ácido disulfónico, 1,4-BDS, 2,6-NDS, y PIPES tienen el efecto de estabilización de hemoglobina.

5 Ejemplo comparativo 1

Fueron preparadas muestras de manera similar al Ejemplo 1, excepto que fue añadido 8-anilino-1-naftalenosulfonato (en adelante en la presente memoria, denominado ANS) o 2-mercaptoetanosulfonato de sodio (en adelante en la presente memoria, denominado MESS) en una cantidad tal para dar 0,01 mol/L en lugar de 1,2-EDS, y luego fueron medidas las concentraciones de hemoglobina. Los resultados son mostrados en la Tabla 5. Además, el porcentaje residual de cada muestra fue representado por un valor relativo con la concentración inmediatamente después de la adición (583 ng/ml) en una muestra de control (solución tampón de fosfato (que no contenía ningún aditivo) que contenía albúmina sérica bovina y NaOH) designada como 100%.

Tabla 5

Solución tampón	Aditivo	Concentración de aditivos [mM]	Porcentaje residual [%]	
			Después de 6 horas de almacenamiento	Después de 24 horas de almacenamiento
Ácido fosfórico (control)	Ninguno	0	49,4	7,1
Ácido fosfórico	1,2-EDS	10	52,5	7,5
Ácido fosfórico	ANS	10	2,6	2,5
Ácido fosfórico	MESS	10	33,4	3,3

(Nota) El porcentaje residual es un valor relativo con la concentración inmediatamente después de la adición (583 ng/ml) en una muestra de control designada como 100%.

Como es mostrado en la Tabla 5, la desnaturalización o degradación de la hemoglobina podría haber procedido en una muestra que no contenga ácido disulfónico sino ácido sulfónico.

5 Por lo tanto, fue demostrado que una solución conservante y una muestra que contiene ácido disulfónico tal como 1,4-BDS, 2,6-NDS y 1,2-EDS pueden mantener los porcentajes residuales de hemoglobina después de 6 horas de almacenamiento y después de 24 horas de almacenamiento a niveles altos, incluso cuando son almacenadas a una temperatura alta de 37°C. Estos resultados indican que la solución conservante y la muestra que contiene el ácido disulfónico de la presente invención suprimen la desnaturalización o degradación de la hemoglobina y tienen el efecto de estabilización de hemoglobina, incluso sometidas al aumento de temperatura y al paso del tiempo.

10 Además, cuando fue añadida una muestra de heces a cada muestra de los Ejemplos 1 a 4 y al Ejemplo comparativo 1 y fueron realizadas mediciones similares, fue observada una tendencia similar a la de los resultados de las mediciones de los Ejemplos 1 a 4 y del Ejemplo comparativo 1.

Ha sido revelado que de acuerdo con la solución conservante para una hemoproteína que contiene ácido disulfónico o una de sus sales y el procedimiento de estabilización de una hemoproteína de la presente invención, la desnaturalización o degradación de una hemoproteína puede ser suprimida y la hemoproteína puede ser estabilizada.

15 **Aplicabilidad industrial**

20 De acuerdo con la solución conservante para una hemoproteína y el procedimiento de estabilización de una hemoproteína de la presente invención, la desnaturalización o degradación de una hemoproteína puede ser suprimida, y la hemoproteína puede ser almacenada de manera estable. Específicamente, las hemoproteínas como aquellas presentes en un diluyente para muestras de heces en un análisis de sangre oculta en heces, una muestra de referencia que contiene una hemoproteína y una muestra de control que contiene una hemoproteína pueden ser almacenadas de forma estable.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de estabilización de una hemoproteína, en el que se hace coexistir un ácido disulfónico o una de sus sales en una muestra que comprende una hemoproteína,
- 5 el ácido disulfónico o una de sus sales tiene al menos un grupo de hidrocarburos de cadena abierta y un grupo de hidrocarburos cíclicos, y
- el ácido disulfónico o una de sus sales es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en:
- un ácido disulfónico o una de sus sales en el que el grupo de hidrocarburos de cadena abierta es un grupo de hidrocarburos ramificados o lineales y la cadena principal del grupo de hidrocarburos de cadena abierta ramificados o del grupo de hidrocarburos de cadena abierta lineales tiene uno cualquiera de 1 a 10 átomos de carbono; y
- 10 un ácido disulfónico o una de sus sales en el que el grupo de hidrocarburos cíclicos es un grupo cicloalquileo o un grupo arilo y el grupo de hidrocarburos cíclicos tiene uno cualquiera de 3 a 10 átomos de carbono;
- y en la que la hemoproteína es hemoglobina, mioglobina, peroxidasa, o catalasa.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ácido disulfónico consiste en un grupo de hidrocarburos de cadena abierta o cíclicos y dos grupos sulfona.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ácido disulfónico tiene un sustituyente y el sustituyente es un grupo halógeno y/o un grupo hidroxilo.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ácido disulfónico o una de sus sales es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en ácido metanodisulfónico, ácido etanodisulfónico, ácido propanodisulfónico, ácido butanodisulfónico y ácido naftalenodisulfónico o una de sus sales.
- 20 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-etanosulfónico se hace coexistir en forma adicional en una muestra que comprende dicha hemoproteína.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la concentración del ácido disulfónico o de una de sus sales es de 0,001 mol/L o mayor y 0,3 mol/L o menor.
- 25 7. Un procedimiento de inmunoensayo para una hemoproteína, que comprende una etapa para poner en contacto una hemoproteína con un anticuerpo antihemoproteína, en presencia de un ácido disulfónico o una de sus sales, en el que el ácido disulfónico o una de sus sales tiene al menos un grupo de hidrocarburos de cadena abierta y un grupo de hidrocarburos cíclicos, y
- el ácido disulfónico o una de sus sales es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en:
- 30 un ácido disulfónico o una de sus sales en el que el grupo de hidrocarburos de cadena abierta es un grupo de hidrocarburos ramificados o lineales y la cadena principal del grupo de hidrocarburos de cadena abierta ramificados o del grupo de hidrocarburos de cadena abierta lineales tiene uno cualquiera de 1 a 10 átomos de carbono; y
- 35 un ácido disulfónico o una de sus sales en el que el grupo de hidrocarburos cíclicos es un grupo cicloalquileo o un grupo arilo y el grupo de hidrocarburos cíclicos tiene uno cualquiera de 3 a 10 átomos de carbono;
- y en el que la hemoproteína es hemoglobina, mioglobina, peroxidasa o catalasa.
8. Una solución conservante para una hemoproteína, que comprende un ácido disulfónico o una de sus sales, en la que el ácido disulfónico o una de sus sales tiene al menos un grupo de hidrocarburos de cadena abierta y un grupo de hidrocarburos cíclicos, y el ácido disulfónico o una de sus sales es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en:
- 40 un ácido disulfónico o una de sus sales en el que el grupo de hidrocarburos de cadena abierta es un grupo de hidrocarburos ramificados o lineales y la cadena principal del grupo de hidrocarburos de cadena abierta ramificados o del grupo de hidrocarburos de cadena abierta lineales tiene uno cualquiera de 1 a 10 átomos de carbono; y
- 45 un ácido disulfónico o una de sus sales en el que el grupo de hidrocarburos cíclicos es un grupo cicloalquileo o un grupo arilo y el grupo de hidrocarburos cíclicos tiene uno cualquiera de 3 a 10 átomos de carbono;
- y en la que la hemoproteína es hemoglobina, mioglobina, peroxidasa o catalasa.

9. La solución conservante de la reivindicación 8, en la que el ácido disulfónico consiste en un grupo de hidrocarburos de cadena abierta o cíclicos y dos grupos sulfona.
10. La solución conservante de la reivindicación 8, en la que el ácido disulfónico tiene un sustituyente y el sustituyente es un grupo halógeno y/o un grupo hidroxilo.
- 5 11. La solución conservante de la reivindicación 8, en la que el ácido disulfónico o una de sus sales es al menos una seleccionado del grupo que consiste en ácido metanodisulfónico, ácido etanodisulfónico, ácido propanodisulfónico, ácido butanodisulfónico y ácido naftalenodisulfónico o una de sus sales.
12. La solución conservante de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en la que la concentración del ácido disulfónico o de una de sus sales es de 0,001 mol/L o mayor y 0,3 mol/L o menor.
- 10 13. La solución conservante de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, que además comprende ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-etanosulfónico.
14. La solución conservante de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, que además comprende una hemoproteína utilizada como una muestra de referencia o muestra de control.
15. La solución conservante de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, que es utilizada para inmunoensayo.