

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 982 322**

51 Int. Cl.:

G01N 30/88 (2006.01)

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/34 (2006.01)

G01N 33/72 (2006.01)

G01N 30/96 (2006.01)

G01N 30/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2019 PCT/JP2019/016633**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2019 WO19203302**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2019 E 19788856 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024 EP 3783359**

54 Título: **Método de análisis de hemoglobina**

30 Prioridad:

18.04.2018 JP 2018079937

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

15.10.2024

73 Titular/es:

**SEKISUI MEDICAL CO., LTD. (100.0%)
1-3, Nihonbashi 2-chome, Chuo-ku
Tokyo 103-0027, JP**

72 Inventor/es:

**TAIRA, HIROAKI;
SUNAMURA, EI-CHIRO;
MATSUDA, KOHEI y
YOTANI, TAKUYA**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 982 322 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de análisis de hemoglobina

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método de análisis de hemoglobina.

10 **Antecedentes de la técnica**

10

La hemoglobina (Hb) es una cromoproteína que consiste en hemo (porción de pigmento) que se une a oxígeno y globina que porta el hemo, y está implicada en el transporte de oxígeno a las células por todo el cuerpo. El polipéptido de globina humana normal tiene cuatro subunidades denominadas cadenas α , β , γ y δ , y éstas constituyen tetrámeros que consisten en dos cadenas α y dos cadenas distintas de α . Hay tres tetrámeros presentes en la Hb humana normal: HbA ($\alpha_2\beta_2$), HbA2 ($\alpha_2\delta_2$) y HbF ($\alpha_2\gamma_2$), pero HbA es el más común. HbA incluye principalmente HbA0 y HbA1c glicada, y HbA1c se usa como marcador para la diabetes, y similares.

15

20

La conformación anómala de subunidades de globina provoca hemoglobinopatía, mientras que una formación deficiente de subunidades de globina provoca talasemia, todas las cuales dan como resultado anemia y, en casos más graves, hemólisis, subdesarrollo, deformidad ósea, y similares. La hemoglobinopatía se diagnostica generalmente detectando Hb anómala tal como HbS, HbC, HbE y HbD. La talasemia se clasifica ampliamente en α -talasemia debido a una formación deficiente de cadenas α y β -talasemia debido a una formación deficiente de cadenas β , y se diagnostica generalmente usando como índice los altos valores de HbA2, HbF, y similares.

25

Hay métodos para detectar anomalías en la hemoglobina que usan cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). El documento de patente 1 describe que es posible separar HbS, HbC, HbE y HbD, que son Hb anómalas, y los marcadores de talasemia HbA2 y HbF mediante HPLC usando una elución en gradiente en la que se alimentan secuencialmente una pluralidad de eluyentes que contienen una sal de metal dialcalino monohidrogenada de ácido fosfórico (componente 1) y una sal de metal monoalcalino dihidrogenada de ácido fosfórico (componente 2) en razones diferentes. El documento de patente 2 describe que HbA0, HbS y HbC se separaron mediante cromatografía de líquidos de intercambio iónico usando un eluyente que contenía un reactivo de par iónico y que tenía un pH en el intervalo de 7,1 a 7,3. El documento de patente 3 describe un método para analizar hemoglobina S usando un eluyente que tenía un pH de 6,88 a 7,50 o hemoglobina A2 usando un eluyente que tenía un pH de 6,60 a 6,80 mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de intercambio catiónico.

30

35

Lista de referencias**Bibliografía de patentes**

40

Documento de patente 1: JP-A-2016-27326

Documento de patente 2: JP-A-2010-237110

45

Documento de patente 3: WO 2011/096420

El documento EP 2 960 648 A1 da a conocer un método de medición de al menos una clase de hemoglobina que comprende realizar cromatografía de líquidos de alta resolución.

50

El documento US 2006/102478 A1 da a conocer un método para electroforesis capilar en disolución libre a un pH alcalino para analizar muestras que comprenden hemoglobina.

El documento JP 2001 221788 A da a conocer un método para medir hemoglobina y similares mediante cromatografía de líquidos de intercambio catiónico.

55

Sumario de la invención**Problema que va a resolverse mediante la invención**

60

La presente invención se refiere al contenido de las reivindicaciones 1 a 15, en particular a un método para separar y detectar diversas hemoglobinas incluyendo hemoglobinas anómalas y marcadores de talasemia a partir de una muestra de sangre.

Medios para resolver el problema

Por consiguiente, la presente invención proporciona lo siguiente.

[1] Un método para analizar hemoglobinas, que comprende

5 separar hemoglobinas en una muestra mediante cromatografía de intercambio catiónico,

en el que se usa un eluyente que tiene un pH de 8,1 o más y una presión osmótica de 40 mOsm/kg o menos para la separación de las hemoglobinas.

10 [2] El método según el punto [1], en el que el eluyente comprende un tampón sin iones metálicos.

[3] El método según el punto [2], en el que el tampón es bicina, tricina o TES.

15 [4] El método según el punto [2] o [3], en el que la concentración del tampón en el eluyente es de 2 a 17 mmol/l.

[5] El método según uno cualquiera de los puntos [1] a [4], en el que el eluyente comprende un agente desnaturalizante de hemoglobina.

20 [6] El método según uno cualquiera de los puntos [1] a [5], en el que las hemoglobinas se separan mediante elución en gradiente usando el eluyente.

[7] El método según el punto [6], en el que la proporción del eluyente en el gradiente aumenta desde el 0 % hasta el 100 %.

25 [8] El método según uno cualquiera de los puntos [1] a [7], en el que se separa al menos una hemoglobina anómala seleccionada del grupo que consiste en HbS, HbC, HbE, HbD y HbO-Arab.

[9] El método según uno cualquiera de los puntos [1] a [8], en el que se separa al menos un marcador de talasemia seleccionado del grupo que consiste en HbA2, HbF, HbH, Hb Bart' y Hb Constant Spring.

30 [10] El método según uno cualquiera de los puntos [1] a [9], en el que la cromatografía es cromatografía de líquidos de alta resolución.

35 [11] Uso de una composición líquida que tiene un pH de 8,1 o más y una presión osmótica de 40 mOsm/kg o menos como eluyente para separar hemoglobinas mediante cromatografía de intercambio catiónico.

[12] El uso según el punto [11], en el que la composición líquida comprende un tampón sin iones metálicos.

40 [13] El uso según el punto [12], en el que el tampón es bicina, tricina o TES.

[14] El uso según el punto [12] o [13], en el que la concentración del tampón en la composición líquida es de 2 a 17 mmol/l.

45 [15] El uso según uno cualquiera de los puntos [11] a [14], en el que la composición líquida comprende un agente desnaturalizante de hemoglobina.

Efectos de la invención

50 Según la presente invención, además de HbA0, que es la hemoglobina principal, pueden separarse de manera rápida y altamente sensible HbA1c, Hb anómala, marcadores de talasemia, y similares, a partir de una muestra de sangre. La presente invención es útil para el diagnóstico sencillo, rápido y altamente sensible de hemoglobinopatía o talasemia.

Breve descripción de los dibujos

55 [Figura 1] Resultados del análisis de HbA0, HbA2, HbS y HbC en el ejemplo 1 mediante cromatografía de intercambio catiónico usando un eluyente que contiene TES.

60 [Figura 2] Resultados del análisis de HbA0, HbA2, HbS y HbC en el ejemplo 2 mediante cromatografía de intercambio catiónico usando un eluyente que contiene tricina.

[Figura 3] Resultados del análisis de HbA0, HbA2, HbS y HbC en el ejemplo 3 mediante cromatografía de intercambio catiónico usando un eluyente que contiene bicina.

65 [Figura 4] Resultados del análisis de HbA0, HbA2 y HbS en el ejemplo comparativo 5.

[Figura 5] Resultados del análisis de HbA0, HbA2 y HbS en el ejemplo comparativo 6.

[Figura 6] Resultados del análisis de HbA0, HbA2 y HbS en el ejemplo comparativo 7.

5 [Figura 7] Resultados del análisis de HbA0, HbA2 y HbS en el ejemplo comparativo 8.

Descripción de las realizaciones

10 El método de análisis de hemoglobina de la presente invención comprende separar hemoglobinas en una muestra mediante cromatografía de intercambio iónico. Como muestra que va a usarse en el método de la presente invención, puede usarse una muestra de sangre que contiene hemoglobinas usada para el análisis de hemoglobina normal. Por ejemplo, puede usarse una muestra de sangre obtenida mediante la hemólisis o dilución de sangre extraída de un ser humano.

15 La cromatografía realizada en el método de la presente invención es preferiblemente cromatografía de líquidos, más preferiblemente cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). La cromatografía de intercambio iónico en la presente invención puede realizarse usando un sistema de cromatografía de líquidos conocido, es decir, una columna de intercambio iónico conectada a un sistema que incluye una bomba para la alimentación de eluyente, un inyector de muestras, un detector, y similares.

20 Preferiblemente, la cromatografía de intercambio iónico realizada en el método de la presente invención es cromatografía de intercambio catiónico usando una columna de intercambio catiónico. La columna de intercambio catiónico usada en el método de la presente invención puede ser una columna empaquetada con una fase estacionaria que tiene un grupo de intercambio catiónico. Los ejemplos del grupo de intercambio
 25 catiónico incluyen un grupo carboxilo, un grupo ácido fosfórico y un grupo ácido sulfónico grupo, entre los cuales es preferible el grupo ácido sulfónico.

Los ejemplos de la fase estacionaria de la columna de intercambio catiónico incluyen partículas de relleno y un cuerpo poroso, siendo preferibles las partículas de relleno. Los ejemplos de las partículas de relleno incluyen
 30 partículas inorgánicas y partículas orgánicas. Los ejemplos de las partículas inorgánicas incluyen partículas compuestas por sílice, zircona, y similares. Los ejemplos de las partículas orgánicas incluyen partículas de polímero natural tales como celulosa, poliaminoácido y quitosano y partículas de polímero sintético tales como poliestireno y éster poliacrílico. Los ejemplos preferibles de la fase estacionaria que tiene un grupo de intercambio catiónico incluyen un relleno que contiene partículas de polímero reticulado obtenidas polimerizando
 35 una mezcla de monómeros acrílicos hidrófilos no reticulables y poliglicidil éteres y una capa de un monómero acrílico que tiene un grupo de intercambio catiónico polimerizada sobre la superficie de las partículas de polímero reticulado, tal como se da a conocer en el documento JP-A-2011-047858.

40 En el método de análisis de hemoglobina de la presente invención, al igual que en el análisis de hemoglobina convencional mediante cromatografía de intercambio iónico, las hemoglobinas en una muestra se adsorben sobre una columna de intercambio iónico y luego se hace pasar un eluyente a través de la columna para eluir las hemoglobinas a partir de la columna, separando de ese modo las hemoglobinas en la muestra. Por tanto, el eluyente usado en el método de análisis de hemoglobina de la presente invención es un eluyente usado para
 45 separar hemoglobinas mediante cromatografía de intercambio iónico. Más preferiblemente, el eluyente es un eluyente usado para la elución de hemoglobinas a partir de una columna de intercambio catiónico en cromatografía de intercambio catiónico.

50 En el método de análisis de hemoglobina de la presente invención, se usa un eluyente que tiene un pH mayor y una presión osmótica menor que en el método de análisis de hemoglobina convencional. El eluyente usado en la presente invención tiene preferiblemente un pH de 8,1 o más. Más específicamente, el pH del eluyente es preferiblemente de 8,1 o más, más preferiblemente de 8,2 o más, de manera adicionalmente preferible de 8,3 o más, aunque preferiblemente de 10,0 o menos, más preferiblemente de 9,0 o menos y de manera adicionalmente preferible de 8,6 o menos. Si el eluyente tiene un pH de menos de 8,1, la elución de hemoglobina, particularmente HbC, a partir de la columna puede ser insuficiente, mientras que si el pH supera
 55 10, la separación de HbS y HbC en particular puede ser insuficiente. Los ejemplos del intervalo de pH del eluyente usado en la presente invención incluyen pH de 8,1 a 10,0, pH de 8,1 a 9,0, pH de 8,1 a 8,6, pH de 8,2 a 10,0, pH de 8,2 a 9,0, pH de 8,2 a 8,6, pH de 8,3 a 10,0, pH de 8,3 a 9,0 y pH de 8,3 a 8,6. En cambio, el pH del eluyente usado en el método de análisis de hemoglobina convencional es habitualmente un pH de aproximadamente 5,0 a 8,0.

60 La presión osmótica del eluyente usado en la presente invención es preferiblemente de 40 mOsm/kg o menos. Más específicamente, la presión osmótica del eluyente es preferiblemente de 40 mOsm/kg o menos, más preferiblemente de 37 mOsm/kg o menos, de manera adicionalmente preferible de 36 mOsm/kg o menos, aunque preferiblemente de 15 mOsm/kg o más, más preferiblemente de 19 mOsm/kg o más, de manera
 65 adicionalmente preferible de 26 mOsm/kg o más. Si la presión osmótica del eluyente es menor de 15 mOsm/kg, la elución de hemoglobina, particularmente HbA0 y HbA2, puede ser insuficiente, mientras que si la presión

osmótica supera 40 mOsm/kg, la separación entre hemoglobinas, particularmente HbA0 y HbA2, es deficiente. Los ejemplos del intervalo de la presión osmótica del eluyente usado en la presente invención incluyen de 15 a 40 mOsm/kg, de 15 a 37 mOsm/kg, de 15 a 36 mOsm/kg, de 19 a 40 mOsm/kg, de 19 a 37 mOsm/kg, de 19 a 36 mOsm/kg, de 26 a 40 mOsm/kg, de 26 a 37 mOsm/kg y de 26 a 36 mOsm/kg. En cambio, en la separación
 5 convencional de hemoglobinas mediante cromatografía, la composición del eluyente no está diseñada desde el punto de vista del ajuste de la presión osmótica, y la presión osmótica del eluyente convencionalmente usado es habitualmente de aproximadamente 125 a 570 mOsm/kg. El valor de la presión osmótica en la presente memoria descriptiva se refiere al valor de la presión osmótica medida mediante crioscopia. La presión osmótica puede medirse usando un osmómetro disponible comercialmente, por ejemplo, osmómetro 3250 (fabricado por
 10 Advanced Instruments), y similares. Además, en la presente memoria descriptiva, la unidad de presión osmótica, mOsm/kg, significa mOsm/kg de H₂O, que también puede expresarse como mOsm/l o mOsm.

Con el fin de preparar un eluyente que tenga los intervalos de pH y presión osmótica anteriores, en la presente invención, el eluyente contiene un tampón sin iones metálicos. Dado que las disoluciones tampón generalmente
 15 usadas en un eluyente convencional, tales como una disolución tampón fosfato, contienen iones metálicos, es difícil lograr simultáneamente un pH alto y una presión osmótica baja. Los ejemplos del tampón sin iones metálicos incluyen tampones de Good, entre los cuales es preferible la bicina (N,N-bis(2-hidroxietyl)glicina), la tricina (N-[tris(hidroxietyl)metil]glicina) o el TES (ácido N-tris(hidroxietyl)metil-2-aminoetanosulfónico), y es más preferible el TES.

La concentración del tampón mencionado anteriormente en el eluyente usado en la presente invención puede ser una concentración que puede ajustar el pH y la presión osmótica del eluyente final a los intervalos anteriores, teniendo en cuenta al mismo tiempo los efectos de los aditivos y similares descritos a continuación. La
 20 concentración del tampón en el eluyente es preferiblemente de 2 mmol/l o más, más preferiblemente de 2,5 mmol/l o más, de manera adicionalmente preferible de 5 mmol/l o más, aunque preferiblemente de 17 mmol/l o menos, más preferiblemente de 15 mmol/l o menos, de manera adicionalmente preferible de 12,5 mmol/l o menos. Los ejemplos del intervalo de la concentración del tampón en el eluyente usado en la presente invención incluyen de 2 a 17 mmol/l, de 2 a 15 mmol/l, de 2 a 12,5 mmol/l, de 2,5 a 17 mmol/l, de 2,5 a 15 mmol/l, de 2,5 a 12,5 mmol/l, de 5 a 17 mmol/l, de 5 a 15 mmol/l y de 5 a 12,5 mmol/l.

Preferiblemente, el eluyente usado en la presente invención es una composición líquida en un estado de disolución que contiene bicina, tricina o TES como tampón. La concentración del tampón en el eluyente es de 2 a 17 mmol/l, y el eluyente tiene una presión osmótica de 15 a 40 mOsm/kg y un pH preferiblemente de 8,1 a 10,0,
 25 más preferiblemente de 8,2 a 9,0, de manera adicionalmente preferible de 8,2 a 8,6 y de manera aún más preferible de 8,3 a 8,6.

Más preferiblemente, el eluyente usado en la presente invención contiene bicina, tricina o TES como tampón, la concentración del tampón en el eluyente es de 2,5 a 15 mmol/l, y el eluyente tiene una presión osmótica de 15 a 37 mOsm/kg y un pH preferiblemente de 8,1 a 10,0, más preferiblemente de 8,2 a 9,0, de manera adicionalmente
 30 preferible de 8,2 a 8,6 y de manera aún más preferible de 8,3 a 8,6.

De manera adicionalmente preferible, el eluyente usado en la presente invención contiene bicina, tricina o TES como tampón, la concentración del tampón en el eluyente es de 5 a 15 mmol/l, y el eluyente tiene una presión osmótica de 19 a 37 mOsm/kg y un pH preferiblemente de 8,1 a 10,0, más preferiblemente de 8,2 a 9,0, de
 35 manera adicionalmente preferible de 8,2 a 8,6 y de manera aún más preferible de 8,3 a 8,6.

De manera aún más preferible, el eluyente usado en la presente invención contiene bicina, tricina o TES como tampón, la concentración del tampón en el eluyente es de 5 a 15 mmol/l, y el eluyente tiene una presión osmótica de 26 a 36 mOsm/kg y un pH preferiblemente de 8,2 a 9,0, de manera adicionalmente preferible de 8,2 a 8,6 y de
 40 manera aún más preferible de 8,3 a 8,6.

De manera aún más preferible, el eluyente usado en la presente invención contiene bicina, tricina o TES como tampón, la concentración del tampón en el eluyente es de 5 a 12,5 mmol/l, y el eluyente tiene una presión osmótica de 26 a 36 mOsm/kg y un pH de 8,3 a 8,6.

El eluyente usado en la presente invención puede contener, además del tampón descrito anteriormente, un disolvente y aditivos tales como un agente desnaturizante de hemoglobina, un agente de unión a hierro hemo trivalente, un agente de ajuste de pH y un tensioactivo.

Preferiblemente, el eluyente usado en la presente invención contiene un agente desnaturizante de hemoglobina. El agente desnaturizante de hemoglobina puede ser un agente oxidante que puede cambiar el hierro hemo de la hemoglobina de divalente a trivalente para generar metahemoglobina. Los ejemplos de tal agente oxidante incluyen sales de nitrito, ferricianuro de potasio, azul de metileno, peróxido de hidrógeno, ácido
 45 ascórbico y sulfuro de hidrógeno. Entre estos, son preferibles las sales de nitrito, y es más preferible el nitrito de sodio o el nitrito de potasio. La concentración del agente desnaturizante de hemoglobina en el eluyente es preferiblemente de 0,05 a 15 mmol/l, más preferiblemente de 1,0 a 10 mmol/l.

Preferiblemente, el eluyente usado en la presente invención contiene un agente de unión a hierro hemo trivalente. El agente de unión a hierro hemo trivalente estabiliza la metahemoglobina producida por el agente desnaturalizante de hemoglobina y estabiliza su comportamiento de elución. Los ejemplos del agente de unión a hierro hemo trivalente incluyen azidas y cianuros. Los ejemplos de azidas incluyen azida de sodio, azida de difenilfosforilo, azida de 4-dodecibencenosulfonilo, azida de 4-acetilaminobencenosulfonilo, azida de potasio, azida de litio, azida de hierro, azida de hidrógeno, azida de plomo, azida de mercurio, azida de cobre y azida de plata. Los ejemplos de cianuros incluyen cianuro de potasio, cianuro de hidrógeno, cianuro de sodio, cianuro de plata, cianuro de mercurio, cianuro de cobre, cianuro de plomo, cianuro de hierro, cianuro de litio y cianuro de amonio. Preferiblemente, el agente de unión a hierro hemo trivalente es una azida, más preferiblemente azida de sodio. La concentración del agente de unión a hierro hemo trivalente en el eluyente es preferiblemente de 0,05 a 15 mmol/l, más preferiblemente de 0,5 a 10 mmol/l.

Los ejemplos del agente de ajuste de pH incluyen ácidos y bases conocidos. Los ejemplos de ácidos incluyen ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y ácido sulfúrico, y los ejemplos de bases incluyen hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de litio, hidróxido de magnesio, hidróxido de bario e hidróxido de calcio.

Los ejemplos del disolvente incluyen disolventes orgánicos solubles en agua tales como metanol, etanol, acetonitrilo y acetona. Es preferible que la concentración del disolvente sea tal que las sales y similares no precipiten, por ejemplo, preferiblemente del 80 % (v/v) o menos, y un intervalo más preferible es del 0,1 % (p/p) o más y del 50 % (p/p) o menos.

Preferiblemente, en el método de análisis de hemoglobina de la presente invención, las hemoglobinas se separan mediante elución en gradiente usando el eluyente anterior. Preferiblemente, en el método de la presente invención, el eluyente anterior es el eluyente B (a continuación en el presente documento, denominado disolución B o simplemente B) y otro eluyente es el eluyente A (a continuación en el presente documento, denominado disolución A o simplemente A), y se aplica un gradiente entre disolución A y disolución B de modo que la proporción de disolución B se aumente gradualmente.

El eluyente A puede contener un tampón que contiene un compuesto salino conocido. Los ejemplos de tampones que pueden estar contenidos en el eluyente A incluyen disoluciones tampón que contienen un ácido orgánico o un ácido inorgánico. Los ejemplos de ácidos orgánicos incluyen ácido cítrico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido málico y sales de los mismos, y los ejemplos de ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido bórico, ácido acético, ácido perclórico y sales de los mismos. La disolución tampón usada para el eluyente A puede contener uno cualquiera de estos ácidos orgánicos y ácidos inorgánicos o una combinación de dos o más de los mismos. Entre estos, es preferible una disolución tampón que contiene una sal de fosfato, una sal de succinato o una sal de perclorato. Los ejemplos de sales de fosfato incluyen una sal de sodio y una sal de potasio, siendo preferible el fosfato de monosodio y el fosfato de disodio. Los ejemplos de sales de succinato incluyen una sal de sodio y una sal de potasio, siendo preferible el succinato de monosodio y el succinato de disodio. Los ejemplos de sales de perclorato incluyen perclorato de sodio. Estas sales de fosfato, sales de succinato y sales de perclorato pueden usarse solas, o pueden usarse dos o más de ellas en combinación.

El eluyente A puede contener, además del tampón descrito anteriormente, un disolvente y aditivos (por ejemplo, un agente desnaturalizante de hemoglobina, un agente de unión a hierro hemo trivalente, un agente de ajuste de pH, un tensioactivo, y similares, tal como se describió anteriormente) similares a los que pueden estar contenidos en el eluyente B tal como se describió anteriormente.

El pH del eluyente A es preferiblemente de 5,0 o más, más preferiblemente de 5,2 o más y preferiblemente de 6,0 o menos, más preferiblemente de 5,8 o menos. El intervalo de pH del eluyente A es preferiblemente de 5,0 a 6,0, más preferiblemente de 5,2 a 5,8. Además, la presión osmótica del eluyente A es preferiblemente de 130 mOsm/kg o más, más preferiblemente de 150 mOsm/kg o más y preferiblemente de 210 mOsm/kg o menos, más preferiblemente de 190 mOsm/kg o menos. El intervalo de la presión osmótica del eluyente A es preferiblemente de 130 a 210 mOsm/kg, más preferiblemente de 150 a 190 mOsm/kg. En una realización preferible, el eluyente A tiene un pH de 5,0 a 6,0 y una presión osmótica de 130 a 210 mOsm/kg, más preferiblemente de 150 a 190 mOsm/kg. En una realización más preferible, el eluyente A tiene un pH de 5,2 a 5,8 y una presión osmótica de 130 a 210 mOsm/kg, más preferiblemente de 150 a 190 mOsm/kg.

Preferiblemente, en la elución en gradiente en el método de la presente invención, en primer lugar, se hace pasar el 100 % de disolución A (0 % de disolución B), luego se aplica un gradiente para aumentar la proporción de disolución B y se aumenta la proporción de disolución B hasta el 100 %. El intervalo de las condiciones de gradiente puede ajustarse de manera apropiada según el rendimiento y similares de la columna, y no está particularmente limitado. Un ejemplo del gradiente es el siguiente: A:B = 100:0 → la proporción de B se aumenta hasta el 50 al 98 % en volumen (preferiblemente del 70 al 95 % en volumen) → la proporción de B se aumenta adicionalmente de manera gradual → A:B = 0:100. Otro ejemplo del gradiente es el siguiente: A:B = 100:0 → la proporción de B se aumenta de modo que el eluyente tenga generalmente un pH de 6,5 a 8,0 y una presión

osmótica de 20 a 100 mOsm/kg → la proporción de B se aumenta adicionalmente de manera gradual → A:B = 0:100. Si es necesario, puede seguir un tiempo para hacer pasar una disolución con A:B = 100:0 nuevamente.

5 En una realización, el método de análisis de hemoglobina de la presente invención se usa para la detección de hemoglobina anómala. Los ejemplos de la hemoglobina anómala detectada mediante el método de la presente invención incluyen al menos una seleccionada del grupo que consiste en HbS, HbC, HbE, HbD y HbO-Arab, y la hemoglobina anómala es preferiblemente al menos una seleccionada del grupo que consiste en HbC y HbS. En el método de la presente invención, puede separarse y detectarse cada una de la totalidad de las hemoglobinas anómalas mencionadas anteriormente mediante un único análisis.

10 En otra realización, el método de análisis de hemoglobina de la presente invención se usa para la detección de marcadores de talasemia. Los ejemplos de los marcadores de talasemia detectados mediante el método de la presente invención incluyen al menos uno seleccionado del grupo que consiste en HbA2, HbF, HbH, Hb Bart' y Hb Constant Spring, y el marcador de talasemia es preferiblemente HbA2. En el método de la presente invención, puede separarse y detectarse cada uno de la totalidad de los marcadores de talasemia mencionados anteriormente mediante un único análisis.

20 Además, en el método de análisis de hemoglobina de la presente invención, pueden detectarse tanto las hemoglobinas anómalas como los marcadores de talasemia mencionados anteriormente. Además, además de detectar las hemoglobinas anómalas y/o los marcadores de talasemia, también puede detectarse hemoglobina HbA0 o HbA1c glicada. Por tanto, la presencia o ausencia de hemoglobinas anómalas y marcadores de talasemia en una muestra puede analizarse de una sola vez mediante el método de análisis de hemoglobina de la presente invención, y la presencia o ausencia de hemoglobinas anómalas, marcadores de talasemia y HbA1c en una muestra también puede analizarse de una sola vez. Por tanto, el método de la presente invención permite detectar diversos tipos de hemoglobina mediante un único análisis, y permite de ese modo un diagnóstico sencillo y rápido de hemoglobinopatía y talasemia.

Ejemplos

30 A continuación en el presente documento, la presente invención se describe en detalle con ejemplos, pero la presente invención no se limita a los siguientes ejemplos.

(Ejemplo de referencia 1: Preparación de columna para la separación de hemoglobinas)

35 Se disolvió 1,0 g de peróxido de benzoilo (fabricado por Nacalai Tesque, Inc.) como iniciador de polimerización en una mezcla de monómeros obtenida mezclando 200 g de monometacrilato de tetraetilenglicol (fabricado por NOF Corporation) como monómero acrílico hidrófilo no reticulable y 200 g de diglicidil éter de polietilenglicol (fabricado por NOF Corporation) como poliglicidil éter. Se dispersó la mezcla obtenida en 5 l de una disolución acuosa al 4 % en peso de poli(alcohol vinílico) ("Gohsenol GH-20", fabricado por Nippon Synthetic Chemical Industry Co., Ltd.), se calentó hasta 80 °C bajo una atmósfera de nitrógeno mientras se agitaba y se polimerizó durante 1 hora. Después de disminuir la temperatura hasta 30 °C, se añadieron 100 g de ácido 2-metacrilamido-2-metilpropanosulfónico (fabricado por Toagosei Co., Ltd.) al sistema de reacción como monómero acrílico que tiene un grupo de intercambio catiónico y se realizó una reacción de polimerización durante 1 hora calentando nuevamente hasta 80 °C. Se lavaron las partículas de polímero reticulado obtenidas con agua de intercambio iónico y acetona para obtener partículas de polímero reticulado en las que se habían introducido grupos ácido sulfónico. Se empaquetó el relleno de columna obtenido para la separación de hemoglobinas en una columna de acero inoxidable que tenía un diámetro interno de 4 mm y una longitud de 20 mm para preparar una columna de intercambio catiónico para la separación de hemoglobinas.

50 (Ejemplo de referencia 2: Preparación de muestras)

Muestra A: se preparó la muestra diluyendo de manera apropiada una muestra de sangre extraída de un sujeto sano con una disolución tampón fosfato (pH 7,00) que contenía Triton X-100 al 0,1 %.

55 Muestra B: se preparó la muestra diluyendo de manera apropiada nivel 2 de control de hemoglobina A2 Lyphocheck (marca registrada) (fabricado por Bio-Rad, que contiene HbA0, HbA2 y HbS) con una disolución tampón fosfato (pH 7,00) que contenía Triton X-100 al 0,1 %.

60 Muestra C: se preparó la muestra diluyendo de manera apropiada hemocontrol AFSC (fabricado por Helena Laboratories, que contiene HbA0, HbS y HbC) con una disolución tampón fosfato (pH 7,00) que contenía Triton X-100 al 0,1 %.

Muestra D: se preparó la muestra diluyendo de manera apropiada hemoglobina A2 (fabricada por Sigma Aldrich, que contiene HbA2) con una disolución tampón fosfato (pH 7,00) que contenía Triton X-100 al 0,1 %.

65

ES 2 982 322 T3

(Prueba 1)

Se realizó un análisis de hemoglobina en las muestras A a C preparadas en el ejemplo de referencia 2. A continuación se muestran las condiciones de análisis.

5 Dispositivo de HPLC: serie Prominence 20A (fabricado por Shimadzu Corporation)

Detector: SPD-M20A (fabricado por Shimadzu Corporation)

Bomba de alimentación: LC-20AD (fabricada por Shimadzu Corporation)

10

Unidad de desaireación: DGU-20A5R (fabricada por Shimadzu Corporation)

Horno de la columna: CTO-20AC (fabricado por Shimadzu Corporation)

15 Inyector automático: SIL-20AC (fabricado por Shimadzu Corporation)

Columna: columna de intercambio catiónico para la separación de hemoglobinas preparada en el ejemplo de referencia 1

20 Velocidad de flujo: 1,1 ml/min

Longitud de onda de detección: 415 nm

Volumen de inyección de muestra: 10 µl

25

Eluyentes

Eluyente A: disolución tampón que contiene 40 mmol/l de succinato de sodio, 45 mmol/l de perclorato de sodio y 1 mmol/l de azida de sodio (pH 5,3, presión osmótica: 170 mOsm/kg)

30

Eluyente B: eluyentes B1 a B6 (tabla 1)

Gradiente: tal como se muestra en la tabla 2

35 Medidor de pH: F-52 (fabricado por Horiba, Ltd.)

Osmómetro: osmómetro 3250 (fabricado por Advanced Instruments)

[Tabla 1]

40

	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3
Eluyente B	B1	B2	B3
Composición (mmol/l)			
TES	10	-	-
Tricina	-	10	-
Bicina	-	-	10
Nitrito de sodio	5,0	5,0	5,0
Azida de sodio	1,0	1,0	1,0
pH*	8,4	8,4	8,4
Presión osmótica (mOsm/kg)	31	25	24
	Ejemplo 4	Ejemplo 5	Ejemplo 6
Eluyente B	B4	B5	B6
Composición (mmol/l)			
TES	10	5,0	2,5
Nitrito de sodio	5,0	5,0	5,0
Azida de sodio	1,0	1,0	1,0
pH*	8,5	8,5	8,5
Presión osmótica (mOsm/kg)	31	23	19

* Ajustado con una disolución acuosa de hidróxido de sodio 1 N

[Tabla 2]

Gradiente

Tiempo de medición (min)	Concentración de eluyente B (% en volumen)		
	Ejemplos 1-4	Ejemplo 5	Ejemplo 6
0	0	0	0
0,99	0	0	0
1	72,5	86,0	92,5
4,5	77,5	91,0	97,5
5,17	100	100	100
5,5	100	100	100
5,51	0	0	0
6	0	0	0

5

Los resultados del análisis para las muestras A a C en los ejemplos 1 a 6 se muestran en la tabla 3. Los cromatogramas de las muestras A a C obtenidas en los ejemplos 1, 2 y 3 se muestran en las figuras 1, 2 y 3, respectivamente. En los ejemplos 1 a 6, se detectaron cada una de HbA0, HbA2, HbS y HbC como un pico separado. Los presentes resultados indican que HbA0, HbA2, HbS y HbC pueden detectarse usando un eluyente que contiene el tampón TES, tricina o bicina.

10

[Tabla 3]

	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo 4	Ejemplo 5	Ejemplo 6
Eluyente B	B1	B2	B3	B4	B5	B6
Detección						
HbA0 (muestras A, B, C)	+	+	+	+	+	+
HbA2 (muestras A, B)	+	+	+	+	+	+
HbS (muestras B, C)	+	+	+	+	+	+
HbC (muestra C)	+	+	+	+	+	+

+ Pico detectado, - Pico no detectado

15

(Prueba 2)

Se realizó un análisis de hemoglobina en las muestras A a C preparadas en el ejemplo de referencia 2. Las condiciones distintas del eluyente B y las condiciones de gradiente fueron las mismas que en la prueba 1. Como eluyente B, se usaron los eluyentes descritos en las tablas 4 a 6. Para las condiciones de gradiente, se determinó de manera apropiada la razón de mezclado del eluyente A y el eluyente B de modo que HbA0 eluyera en 2,1 min. Con el fin de confirmar la elución de HbC, se prolongó de manera apropiada el tiempo cuando la concentración de eluyente B era del 100 %.

20

Los resultados del análisis se muestran en las tablas 4 a 6. Tal como se muestra en la tabla 6, HbC no se detectó en los ejemplos comparativos 1 a 3 usando los eluyentes B que tenían un pH de 8,0. En los ejemplos comparativos 3 y 4 que usan los eluyentes B que tenían una presión osmótica superior a 40 mOsm/kg, HbA2 solapaba el hombro del pico de HbA0 y ambos picos no se separaron suficientemente. En cambio, tal como se muestra en las tablas 4 y 5, en los ejemplos 7 a 18 en los que el pH era mayor de 8,0 y la presión osmótica era de 40 mOsm/kg o menos, se detectaron cada una de HbA0, HbA2, HbS y HbC. Sin embargo, en los ejemplos 10 y 11, la elución de HbA2 fue ligeramente más rápida y los picos de HbA0 y HbA2 tendían a estar próximos entre sí (datos no mostrados). Estos resultados indican que los eluyentes B que tenían un pH de 8,1 o más y una presión osmótica de 40 mOsm/kg o menos son adecuados para el análisis de diversas hemoglobinas.

30

35 [Tabla 4]

	Ejemplo 7	Ejemplo 8	Ejemplo 9	Ejemplo 10	Ejemplo 11	Ejemplo 12
Eluyente B	B7	B8	B9	B10	B11	B12
Composición (mmol/l)						
TES	2,5	5	10	15	17	10

ES 2 982 322 T3

Nitrito de sodio	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Azida de sodio	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Tween 20 (% p/p)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
pH*	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2	8,5
Presión osmótica (mOsm/kg)	15	20	29	37	40	32
Detección						
HbA0 (muestras A, B, C)	+	+	+	+	+	+
HbA2 (muestras A, B)	+	+	+	+	+	+
HbS (muestras B, C)	+	+	+	+	+	+
HbC (muestra C)	+	+	+	+	+	+

* Ajustado con una disolución acuosa de hidróxido de sodio 1 N

+ Pico detectado, - Pico no detectado [Tabla 5]

	Ejemplo 13	Ejemplo 14	Ejemplo 15	Ejemplo 16	Ejemplo 17	Ejemplo 18
Eluyente B	B13	B14	B15	B16	B17	B18
Composición (mmol/l)						
Tricina	10	10	10	-	-	-
Bicina	-	-	-	10	10	10
Nitrito de sodio	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Azida de sodio	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Tween 20 (% p/p)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
pH*	8,2	8,4	8,6	8,2	8,4	8,6
Presión osmótica (mOsm/kg)	26	27	28	25	26	27
Detección						
HbA0 (muestras A, B, C)	+	+	+	+	+	+
HbA2 (muestras A, B)	+	+	+	+	+	+
HbS (muestras B, C)	+	+	+	+	+	+
HbC (muestra C)	+	+	+	+	+	+

5 * Ajustado con una disolución acuosa de hidróxido de sodio 1 N

+ Pico detectado, - Pico no detectado

[Tabla 6]

10

	Ejemplo comparativo 1	Ejemplo comparativo 2	Ejemplo comparativo 3	Ejemplo comparativo 4
Eluyente B	B0-1	B0-2	B0-3	B0-4
Composición (mmol/l)				
TES	10	15	20	20
Nitrito de sodio	5,0	5,0	5,0	5,0
Azida de sodio	1,0	1,0	1,0	1,0
Tween 20 (% p/p)	0,05	0,05	0,05	0,05
pH*	8,0	8,0	8,0	8,2
Presión osmótica (mOsm/kg)	27	36	44	46
Detección				
HbA0 (muestras A, B, C)	+	+	Separación insuficiente de A0 y A2	
HbA2 (muestras A, B)	+	+		
HbS (muestras B, C)	+	+	+	+
HbC (muestra C)	-	-	-	+

ES 2 982 322 T3

* Ajustado con una disolución acuosa de hidróxido de sodio 1 N

+ Pico detectado, - Pico no detectado

5 (Prueba 3)

Se realizó un análisis de hemoglobina en la muestra B y la muestra D preparadas en el ejemplo de referencia 2. Las condiciones de análisis distintas del gradiente y el eluyente B fueron las mismas que en la prueba 1. Como eluyente B, se usaron eluyentes que contenían una disolución tampón que contenía fosfato de sodio y perclorato de sodio que tenía el pH y la presión osmóticas descritos en la tabla 7. La composición de los eluyentes descritos en la tabla 7 se basaba en la composición de un eluyente que contenía una disolución tampón fosfato generalmente usada en el análisis de hemoglobina convencional. Las condiciones de gradiente fueron tal como se muestran en la tabla 8.

15 Los resultados del análisis se muestran en la tabla 7. Los cromatogramas de los ejemplos comparativos 5 a 8 se muestran en las figuras 4 a 7. La muestra B contenía de aproximadamente el 5 al 7 % en masa de HbA2, pero en los ejemplos comparativos 5 a 8, el pico de HbA0 y el pico de HbA2 se solapaban, y ambos picos no se separaron suficientemente. Estos resultados indican que HbA0 y HbA2 no pudieron detectarse suficientemente con un eluyente convencionalmente usado que tenía un pH de 8,0 o menos y una presión osmótica de
20 130 mOsm/kg o más.

[Tabla 7]

	Ejemplo comparativo 5	Ejemplo comparativo 6	Ejemplo comparativo 7	Ejemplo comparativo 8
Eluyente B	B0-5	B0-6	B0-7	B0-8
Composición (mmol/l)				
Fosfato de sodio	45	45	45	45
Perclorato de sodio	100	20	10	0
Nitrito de sodio	10	10	10	10
Azida de sodio	10	10	10	10
pH*	7,7	7,7	7,7	7,7
Presión osmótica (mOsm/kg)	330	170	150	130
Detección	Separación insuficiente de A0 y A2			
HbA0 (muestra B)	-			
HbA2 (muestras B y D)	-			
HbS (muestra B)	+	+	+	+

* Ajustado con una disolución acuosa de hidróxido de sodio 1 N

25

+ Pico detectado, - Pico no detectado

[Tabla 8]

30 Gradiente

Tiempo de medición (min)	Concentración de eluyente B (% en volumen)
0	0
0,98	0
1	10
2,15	30
2,17	100
2,25	100
2,27	0
2,77	0

ES 2 982 322 T3

(Prueba 4)

Se realizó un análisis de hemoglobina en las muestras A a C preparadas en el ejemplo de referencia 2, usando los eluyentes B que contenía una disolución tampón fosfato tal como se describe en la tabla 9. Las condiciones distintas del eluyente B fueron las mismas que en la prueba 2. Como eluyente B, se usaron los eluyentes que contenían una disolución tampón fosfato tal como se describe en la tabla 9.

5

Los resultados del análisis se muestran en la tabla 9. En los ejemplos comparativos 9 y 10, la separación entre los picos de HbA0 y HbA2 no fue suficiente, y no se detectaron una o ambas de HbS y HbC. En los ejemplos comparativos 11 a 14, se detectaron HbS y HbC, pero la separación entre los picos de HbA0 y HbA2 no fue suficiente. Los eluyentes B de los ejemplos comparativos 9 a 14 tenían una presión osmótica mayor y un pH mayor o menor que los eluyentes de los ejemplos descritos anteriormente, y no pudieron lograrse las condiciones de un pH de 8,0 o más y una presión osmótica de 40 mOsm/kg o menos. Se pensó que esto había conducido a una detección de hemoglobina insuficiente en los ejemplos comparativos 9 a 14.

10

[Tabla 9]

15

	Ejemplo comparativo 9	Ejemplo comparativo 10	Ejemplo comparativo 11	Ejemplo comparativo 12	Ejemplo comparativo 13	Ejemplo comparativo 14
Eluyente B	B0-9	B0-10	B0-11	B0-12	B0-13	B0-14
Composición (mmol/l)						
Fosfato de sodio	20	20	10	20	20	20
Nitrito de sodio	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Azida de sodio	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Tween 20 (% p/p)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
pH*	6,8	7,4	8,2	8,2	8,6	9,2
Presión osmótica (mOsm/kg)	75	77	41	81	82	81
Detección	Separación insuficiente de A0 y A2					
HbA0 (muestras A, B, C)						
HbA2 (muestras A, B)						
HbS (muestras B, C)	-	+	+	+	+	+
HbC (muestra C)	-	-	+	+	+	+

* Ajustado con una disolución acuosa de hidróxido de sodio 1 N

+ Pico detectado, - Pico no detectado

20 (Prueba 5)

Se realizó un análisis de hemoglobina en las muestras A a C preparadas en el ejemplo de referencia 2. Las condiciones distintas del eluyente B y las condiciones de gradiente fueron las mismas que en la prueba 1. Como eluyente B, se usaron los eluyentes descritos en la tabla 10. Las condiciones de gradiente fueron tal como se muestran en la tabla 11. Los resultados del análisis se muestran en la tabla 10. En ambos ejemplos 19 y 20, pudieron detectarse HbA0, HbA2, HbS y HbC, ya que se separaron bien los picos de HbA0 y HbA2 y también se separaron bien los picos de HbS y HbC.

25

[Tabla 10]

30

	Ejemplo 19	Ejemplo 20
Eluyente B	B19	B20
Composición (mmol/l)		

ES 2 982 322 T3

TES	5,0	5,0
Nitrito de sodio	5,0	2,5
Azida de sodio	1,0	1,0
pH*	8,5	8,5
Presión osmótica (mOsm/kg)	23	18
Detección		
HbA0 (muestras A, B, C)	+	+
HbA2 (muestras A, B)	+	+
HbS (muestras B, C)	+	+
HbC (muestra C)	+	+

* Ajustado con una disolución acuosa de hidróxido de sodio 1 N

+ Pico detectado, - Pico no detectado[Tabla 11]

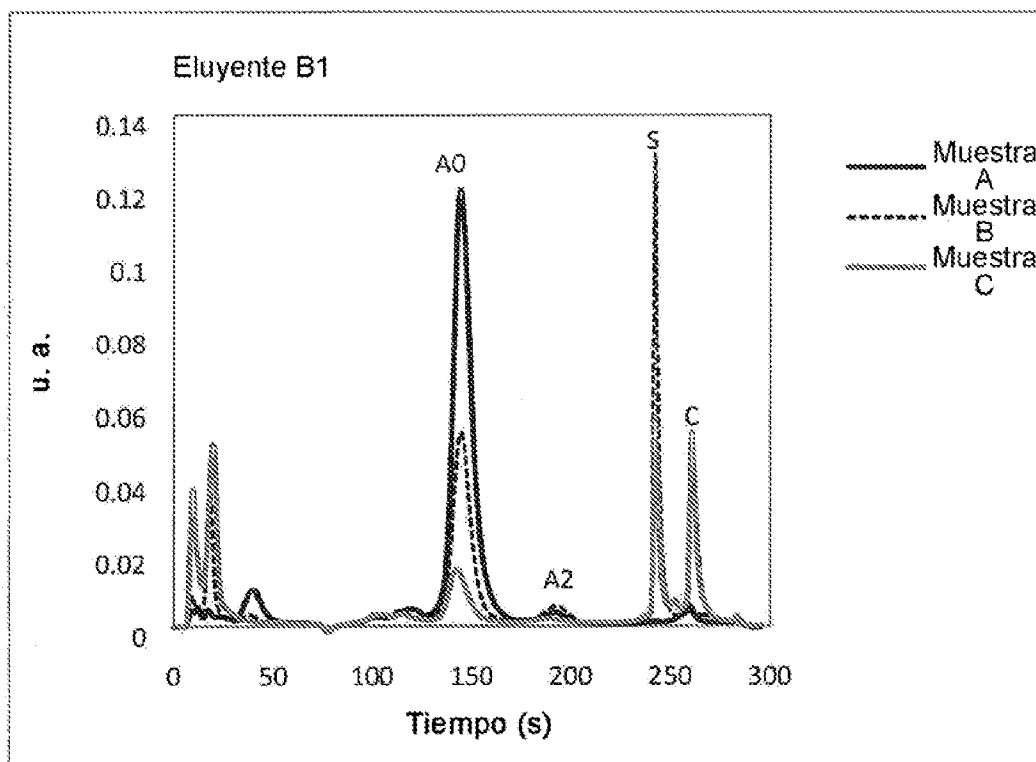
5 Gradiente

Tiempo de medición (min)	Concentración de eluyente B (% en volumen)	
	Ejemplo 19	Ejemplo 20
0	0	0
0,99	0	0
1	86,0	84,7
4,5	91,0	89,7
5,17	100	100
5,5	100	100
5,51	0	0
6	0	0

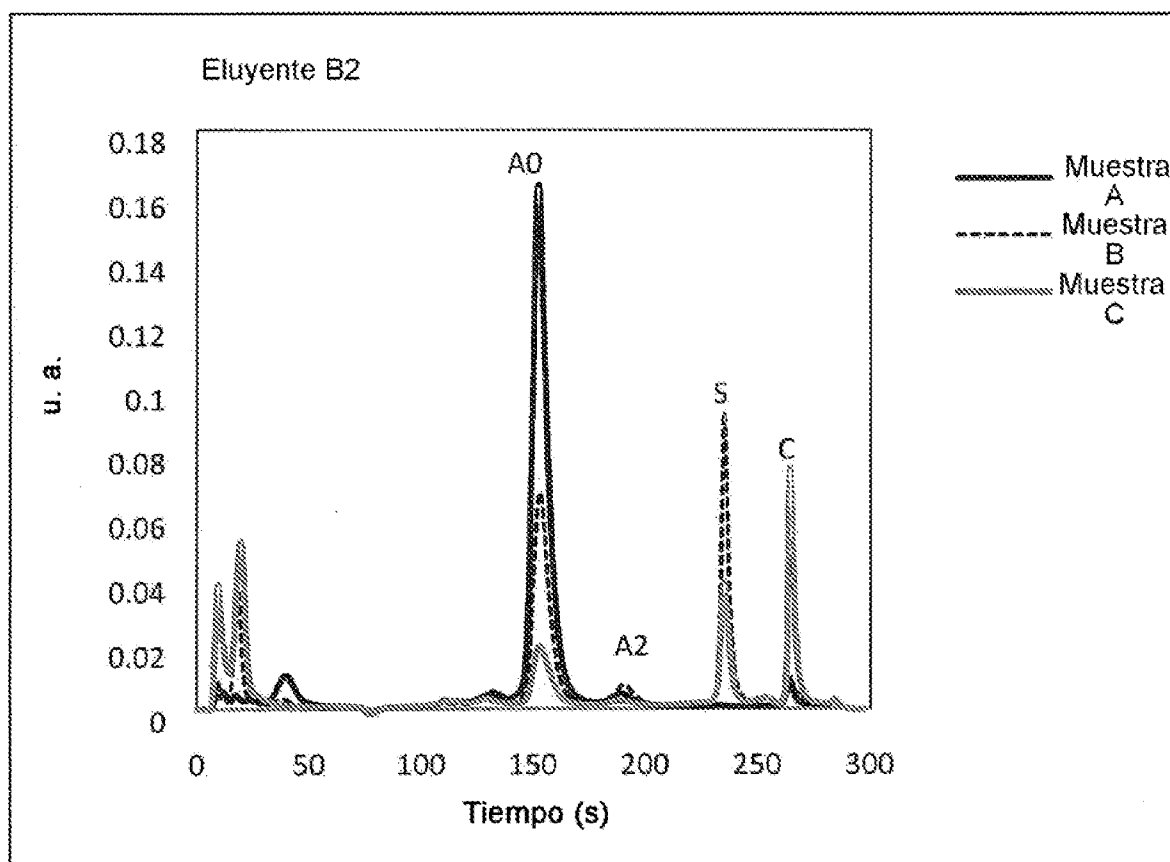
REIVINDICACIONES

1. Método para analizar hemoglobinas, que comprende
- 5 separar hemoglobinas en una muestra mediante cromatografía de intercambio catiónico, caracterizado porque se usa un eluyente que tiene un pH de 8,1 o más y una presión osmótica de 40 mOsm/kg o menos para la separación de las hemoglobinas.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que el eluyente comprende un tampón sin iones metálicos.
3. Método según la reivindicación 2, en el que el tampón es bicina, tricina o TES.
- 15 4. Método según la reivindicación 2 ó 3, en el que la concentración del tampón en el eluyente es de 2 a 17 mmol/l.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el eluyente comprende un agente desnaturizante de hemoglobina.
- 20 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las hemoglobinas se separan mediante elución en gradiente usando el eluyente.
7. Método según la reivindicación 6, en el que la proporción del eluyente en el gradiente aumenta desde el 0 % hasta el 100 %.
- 25 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que se separa al menos una hemoglobina anómala seleccionada del grupo que consiste en HbS, HbC, HbE, HbD y HbO-Arab.
- 30 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que se separa al menos un marcador de talasemia seleccionado del grupo que consiste en HbA₂, HbF, HbH, Hb Bart' y Hb Constant Spring.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la cromatografía es cromatografía de líquidos de alta resolución.
- 35 11. Uso de una composición líquida que tiene un pH de 8,1 o más y una presión osmótica de 40 mOsm/kg o menos como eluyente para separar hemoglobinas mediante cromatografía de intercambio catiónico.
12. Uso según la reivindicación 11, en el que la composición líquida comprende un tampón sin iones metálicos.
- 40 13. Uso según la reivindicación 12, en el que el tampón es bicina, tricina o TES.
14. Uso según la reivindicación 12 ó 13, en el que la concentración del tampón en la composición líquida es de 2 a 17 mmol/l.
- 45 15. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que la composición líquida comprende un agente desnaturizante de hemoglobina.

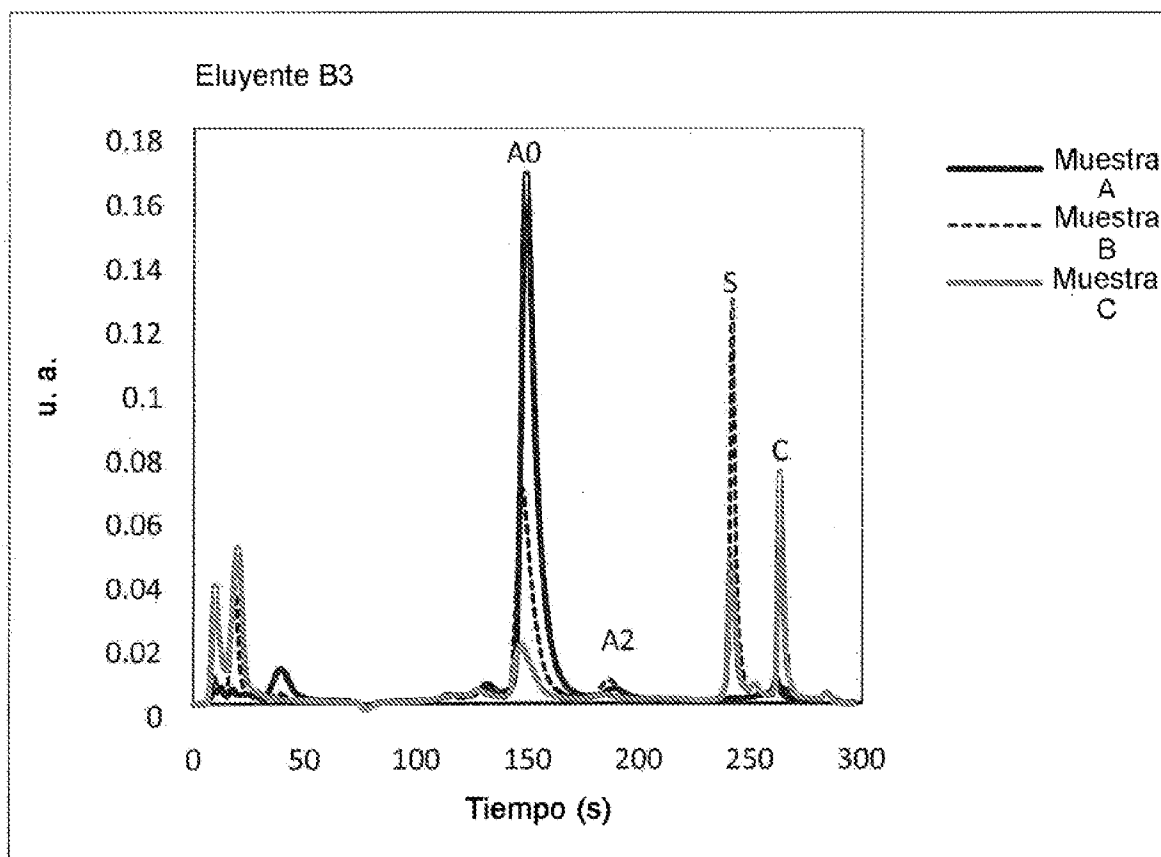
[Figura 1]



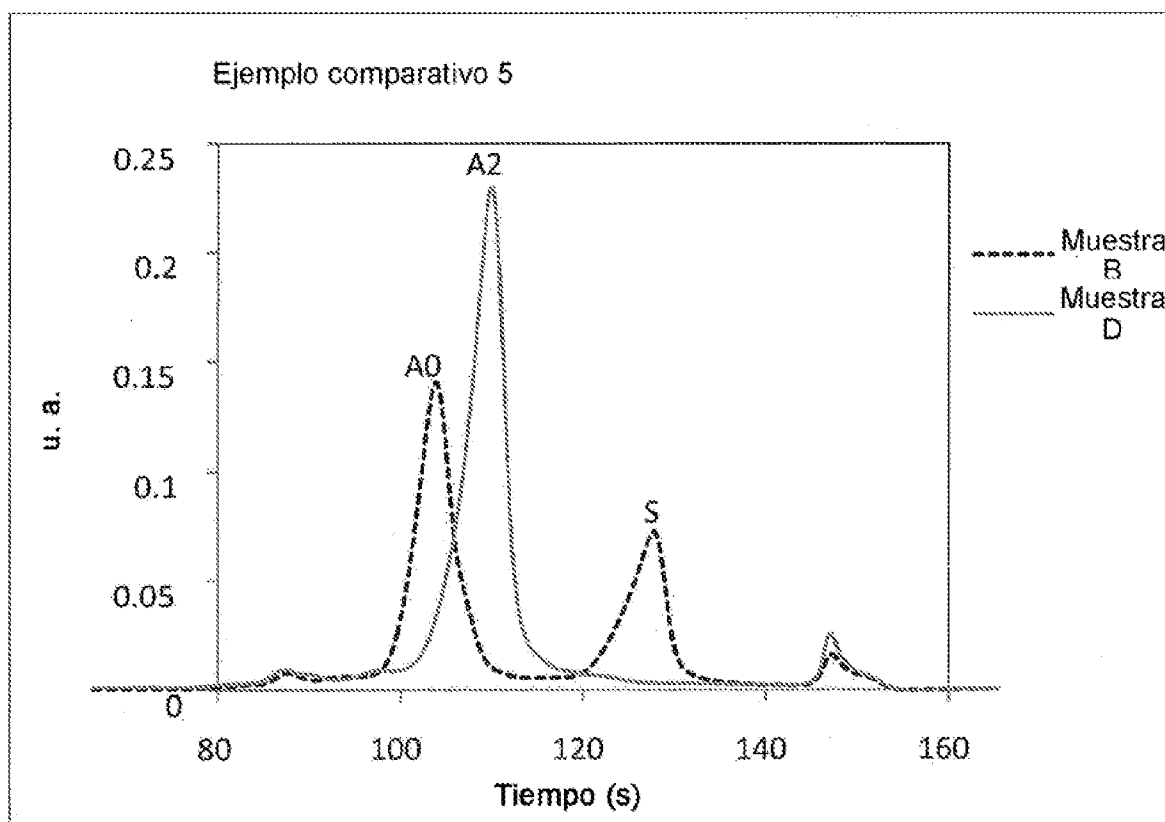
[Figura 2]



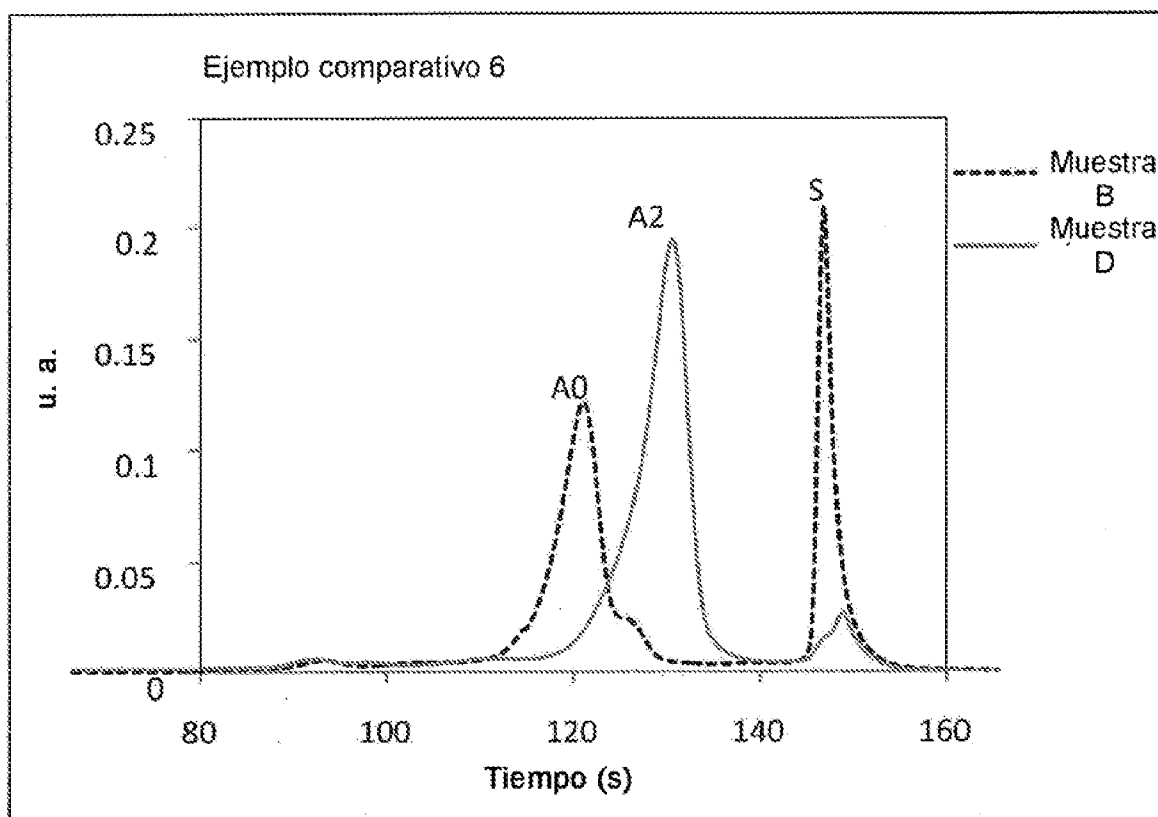
[Figura 3]



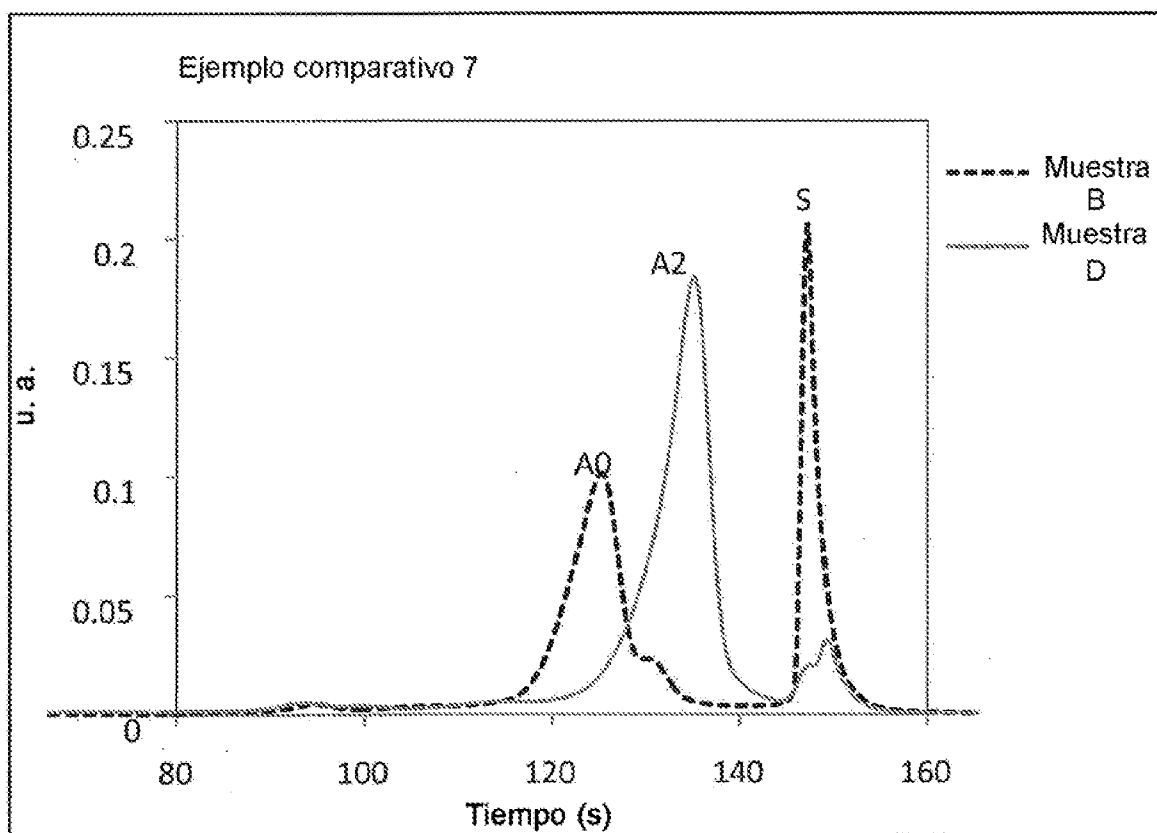
[Figura 4]



[Figura 5]



[Figura 6]



[Figura 7]

