

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
15 de diciembre de 2011 (15.12.2011)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2011/154581 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 14/805 (2006.01) G01N 33/72 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2011/070411

(22) Fecha de presentación internacional:
8 de junio de 2011 (08.06.2011)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201030893 9 de junio de 2010 (09.06.2010) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD** [ES/ES]; Avda. de la Constitución, 18, E-41001 Sevilla (ES). **FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS** [ES/ES]; C/ Profesor Martín Lagos, s/n-4ª Sur, E-28040 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **HERRERA DEL REY, María Teresa** [ES/ES]; Servicio Andaluz de Salud, Avda. de la Constitución, 18, E-41001 Sevilla (ES). **DOMÍNGUEZ PASCUAL, Inmaculada** [ES/ES]; Servicio Andaluz de Salud, Avda. de la Constitución, 18, E-41001 Sevilla (ES). **NARVÁEZ GARCÍA, Mª Carmen** [ES/ES]; Servicio Andaluz de Salud, Avda. de la Constitución, 18, E-41001 Sevilla (ES). **INFANTE FONTÁN, Rocío** [ES/ES]; Servicio Andaluz de Salud, Avda. de la Constitución, 18, E-41001 Sevilla (ES). **GUERRERO MONTÁLVEZ, Juan Miguel** [ES/ES]; Servicio Andaluz de Salud, Avda. de la Constitución, 18, E-41001 Sevilla (ES). **VILLEGAS MARTÍNEZ, Ana** [ES/ES]; Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Clínico San Carlos, C/ Profesor Martín Lagos, s/n-4ª Sur, E-28040 Madrid (ES). **GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, Fernando Ataulfo** [ES/ES]; Fundación para la Investigación Biomédica del

Hospital Clínico San Carlos, C/ Profesor Martín Lagos, s/n-4ª Sur, E-28040 Madrid (ES). **ROPERO GRADILLA, Paloma** [ES/ES]; Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Clínico San Carlos, C/ Profesor Martín Lagos, s/n-4ª Sur, E-28040 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: STRUCTURAL VARIANT OF HAEMOGLOBIN

(54) Título : VARIANTE ESTRUCTURAL DE LA HEMOGLOBINA

(57) Abstract: The present invention provides a novel structural variant of haemoglobin of SEQ ID NO: 1, and also a method for producing data that can be used for the diagnosis and/or monitoring of diseases involving changes in levels of glycosylated haemoglobin or HbA_{1c}, and more specifically diabetes mellitus, in an individual expressing this haemoglobin variant. Said method comprises standardizing the value obtained for the expression of haemoglobin, preferably HbA_{1c}, in a biological sample isolated from an individual as a function of the value obtained for the level of expression of this novel structural variant of haemoglobin in this same biological sample.

(57) Resumen: La presente invención proporciona una nueva variante estructural de la hemoglobina, de SEQ ID NO: 1, así como un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o seguimiento de enfermedades que cursan con alteraciones en los niveles de hemoglobina glicosilada o HbA_{1c}, y más concretamente de la diabetes mellitus, en un individuo que expresa esta variante de la hemoglobina. Dicho método comprende normalizar el valor obtenido para el nivel de expresión de la hemoglobina, preferiblemente de la HbA_{1c}, en una muestra biológica aislada de un individuo en función del valor obtenido para el nivel de expresión de esta nueva variante estructural de la hemoglobina en esa misma muestra biológica.



WO 2011/154581 A1

VARIANTE ESTRUCTURAL DE LA HEMOGLOBINA

La presente invención se encuadra en el campo de la medicina, en concreto, dentro de las variantes estructurales de la hemoglobina que interfieren en los métodos de determinación de los niveles de hemoglobina glicosilada en una muestra biológica y por tanto, de los métodos de obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o seguimiento de enfermedades que cursan con alteraciones en los niveles de hemoglobina glicosilada, concretamente de la diabetes mellitus.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La hemoglobina glicosilada o HbA_{1c} es una hemoglobina en la cual la glucosa se une específicamente a la valina N-terminal de la cadena β de la hemoglobina, en un proceso no enzimático e irreversible. Esta hemoglobina es un marcador bioquímico empleado de manera rutinaria para la evaluación y control de individuos que presentan diabetes mellitus, ya que el valor obtenido tras su cuantificación se encuentra directamente relacionado con los niveles de glucemia del paciente de los últimos 3-4 meses, por lo que es de utilidad para la predicción de posibles complicaciones relacionadas con esta enfermedad, para el seguimiento del tratamiento del paciente e incluso para su diagnóstico. Sin embargo, la exactitud de los métodos de determinación del nivel de la HbA_{1c} se puede ver afectada por la presencia de variantes de la hemoglobina en el paciente estudiado.

Así, en aquellos individuos que presentan algún tipo de hemoglobinopatía, las técnicas analíticas utilizadas para la cuantificación de la HbA_{1c} suelen detectar, junto con ésta, las otras variantes de la hemoglobina (Hb) presentes en ellos cuyos valores alteran los resultados ofrecidos para la hemoglobina glicosilada. En el año 2000, se estimó que 12 millones de individuos con diabetes mellitus

en todo el mundo presentaban también otras enfermedades asociadas a alteraciones en la hemoglobina.

Son muchas las variantes estructurales de la Hb que se han identificado hasta la fecha (Globin Gene Sever. *HbVar: a database of human hemoglobin variants and thalassemias*. <http://globin.cse.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>). Entre las más comunes se encuentran la HbF y las HbS, HbE, HbC y HbD, las cuales son codificadas por la sustitución de un solo aminoácido en la cadena β (Little R. R. and Roberts W. L., 2009, *Journal of Diabetes Science and Technology*, 3(3): 446-451). Otros ejemplos de variantes de este tipo son la denominada Hb Baylor, codificada por la sustitución de una Leu por una Arg en el residuo 81 (EF5) de la β globina, o la Hb La Roche-sur-Yon, codificada por la sustitución de una Leu por una His en esa misma posición.

Las técnicas empleadas en la determinación de los valores de la HbA_{1c} se han ido optimizado de manera que son capaces de detectar y corregir la interferencia que provocan los valores de estas otras variantes conocidas de la Hb con los valores obtenidos para la HbA_{1c}, lo que permite, por tanto, obtener unos valores de esta última normalizados y útiles para el diagnóstico y/o seguimiento de la diabetes mellitus. No obstante, el efecto que cada variante de la Hb produce sobre los resultados obtenidos en los métodos de determinación de la HbA_{1c} varía en función del método empleado y de la variante de la Hb, de manera que los valores de cuantificación de la HbA_{1c} resultantes pueden ser falsamente incrementados o disminuidos dependiendo de la técnica analítica empleada y del tipo de hemoglobinopatía presente en el paciente (Bry L. *et al.*, 2001, *Clinical Chemistry*, 47(2): 153-163). De entre todos los métodos usados para medir los niveles de la HbA_{1c}, los comúnmente empleados son cuatro, a saber, inmunoensayo, HPLC (de sus siglas en inglés *High-Performance Liquid Chromatography*), afinidad de boronato y ensayos enzimáticos.

La identificación de nuevas variantes de la Hb es complicada, a no ser que éstas se manifiesten en una patología clínica, ya que la mayoría de ellas se deben a mutaciones que únicamente originan cambios en la estructura de la molécula que no conllevan manifestaciones fenotípicas. No obstante, las interferencias que las variantes de la Hb producen en los métodos de determinación de la HbA_{1c} por HPLC pueden estudiarse en el cromatograma obtenido, por lo que es importante que los usuarios de estos métodos de medida sean capaces de identificarlas para valorar si el resultado ofrecido es o no aceptable. Así, mediante la observación de los resultados ofrecidos por los métodos de medida de la HbA_{1c}, los expertos han identificado nuevas variantes de la Hb (Sacks D. B., 2003, *Clinical Chemistry*, 49(8): 1245-1247).

Sin embargo, existen variantes de la Hb aun desconocidas que interfieren en la exactitud de estos métodos, por lo que es necesaria su identificación para optimizar los métodos de obtención de datos útiles para determinar los valores de expresión de la HbA_{1c} en los individuos que las expresan, con el fin de mejorar así los métodos de diagnóstico y/o seguimiento de la diabetes mellitus en estos pacientes.

20

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una nueva variante estructural de la hemoglobina, de SEQ ID NO: 1, de ahora en adelante "péptido de la invención", así como un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o seguimiento de enfermedades que cursan con alteraciones en los niveles de hemoglobina glicosilada o HbA_{1c}, y más concretamente de la diabetes mellitus, en un individuo que expresa el péptido de la invención. Dicho método comprende normalizar el valor obtenido para el nivel de expresión de la hemoglobina, preferiblemente de la HbA_{1c}, en una muestra biológica aislada de un individuo en función del valor obtenido para el nivel de expresión del péptido de la invención en esa misma muestra biológica.

En la presente invención, se ha aislado y caracterizado una nueva variante estructural de la Hb que es codificada por el cambio de un aminoácido apolar hidrofóbico, la Leu, por otro de las mismas características, la Phe, en la posición 81 de la β globina. Este cambio responde a una mutación (sustitución de CTC por TTC) en el codon 81 (EF5) del gen de la β globina. Así, la

5 de CTC por TTC) en el codon 81 (EF5) del gen de la β globina. Así, la secuencia de aminoácidos de dicha Hb o péptido de la invención es la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de nucleótidos codificante para la SEQ ID NO: 1 es, preferiblemente, la SEQ ID NO: 2. Esta modificación no afecta a la función ni a la estabilidad del péptido de la invención con respecto a la HbA o Hb normal,

10 aunque origina cambios estructurales que le confieren características que permiten su detección por métodos electroforéticos y cromatográficos.

Como muestran los ejemplos de la presente invención, los métodos de determinación de los niveles de la Hb (o métodos de cuantificación de la Hb), preferiblemente de la HbA_{1c}, detectan no solo ésta sino también el péptido de

15 la invención en aquellas muestras biológicas aisladas de individuos que lo expresan. Así, los valores de expresión de este último interfieren en los valores de expresión de la primera, ofreciendo unos resultados de cuantificación de la Hb, preferiblemente de la HbA_{1c}, alterados que no se corresponden con los

20 reales. Por ello, la presente invención proporciona un método de obtención de datos útiles, de ahora en adelante "método de la invención", para el diagnóstico y/o seguimiento de enfermedades que cursan con alteraciones en los niveles de Hb, preferiblemente de la HbA_{1c}, que comprende cuantificar la cantidad de péptido de la invención en una muestra biológica aislada de un individuo en la

25 que también se ha cuantificado la cantidad de la Hb de interés, preferiblemente de la HbA_{1c}, cuyo valor se desea conocer por ser relevante para el diagnóstico y/o seguimiento de la enfermedad a estudiar. A continuación, en dicho método se normalizan los valores de expresión de esta última Hb en función de los valores de expresión del péptido de la invención. De este modo, se elimina la

30 interferencia producida por los valores de expresión del péptido de la invención en los valores de expresión de la Hb de interés, preferiblemente la HbA_{1c}, obteniéndose así datos útiles para el correcto diagnóstico y/o seguimiento de

estas enfermedades, preferiblemente de la diabetes mellitus, en los pacientes que expresan el péptido de la invención.

Por todo ello, un aspecto de la invención se refiere a un péptido aislado, o
5 “péptido de la invención”, que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1. Otro aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica para la SEQ ID NO: 1, o a una secuencia nucleotídica complementaria a dicho polinucleótido aislado. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el polinucleótido aislado que codifica para la SEQ ID NO: 1
10 comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2.

El péptido de la invención eluye junto con otras hemoglobinas, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, la HbA_{1c}, HbA_{1a}, HbA_{1b}, Hb F, HbLA_{1c}, Hb P3, Hb P4, Hb A0, la HbA₂ o la Hb X, en los métodos de determinación de los
15 niveles de expresión de las mismas, como por ejemplo, en HPLC, como muestran los ejemplos de la presente invención. Por ello, aunque dichos ejemplos se centren en la cuantificación de la HbA_{1c} por ser un dato de valor diagnóstico y/o para el seguimiento de la diabetes mellitus, éstos no pretenden ser limitativos, ya que se entiende que cuando lo que se desee cuantificar sea
20 la cantidad de otras hemoglobinas distintas de ésta para diagnosticar y/o realizar el seguimiento de otras enfermedades que cursen con alteraciones en los niveles de las mismas, el péptido de la invención eluirá con ellas en los métodos de cuantificación, por lo que dichos métodos determinarán los valores de expresión del péptido de la invención junto con los de las otras Hb. Así,
25 estos valores interferirán en los valores de expresión de éstas, y por tanto, habrán de tenerse en cuenta en la normalización de los resultados de expresión obtenidos para estas otras Hb distintas de la HbA_{1c}.

Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso del péptido de la
30 invención para la obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o seguimiento de enfermedades que cursan con alteraciones en los niveles de hemoglobina.

En el contexto de la presente invención el término “hemoglobina” o “Hb” se refiere tanto a la HbA o Hb normal, la cual es una heteroproteína de la sangre, de peso molecular 64.000 Daltons (64 kD), de color rojo, que transporta el oxígeno desde los órganos respiratorios hasta los tejidos, en vertebrados y algunos invertebrados, y que está formada por cuatro cadenas polipeptídicas (globinas) a cada una de las cuales se une un grupo hemo, cuyo átomo de hierro es capaz de unirse de forma reversible al oxígeno; como a cualquier variante estructural de la Hb o derivados de la misma modificados químicamente. Ejemplos de variantes estructurales de la hemoglobina o derivados de la misma modificados químicamente son, aunque sin limitarse, la Hb glicosilada o HbA_{1c}, incluyéndose dentro de ella todas sus variantes, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, la HbA_{1a}, HbA_{1b} o HbA_{1c}; la HbF o Hb fetal, HbLA_{1c}, Hb P3, Hb P4, Hb A0, Hb X, la carboxihemoglobina, carbaminohemoglobina, metahemoglobina, oxihemoglobina, Hb La Roche-sur-Yon, Hb Baylor, HbS, HbE, HbC, HbD, Hb D-Punjab, Hb O-Arab, Hb G-Philadelphia, Hb Hasharon, Hb Korle-Bu, Hb Lepore, Hb M o HbA₂. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la hemoglobina es la hemoglobina glicosilada o HbA_{1c}, la cual es una hemoglobina que presenta una glucosa unida específicamente a la valina N-terminal de la cadena β de la hemoglobina.

Tal y como aparece en la presente invención, el término “enfermedades que cursan con alteraciones en los niveles de hemoglobina” se refiere a cualquier situación patológica en la que los niveles de Hb se encuentren aumentados o disminuidos con respecto a unos valores control tomados de una muestra de referencia procedente de un individuo sano. Así, por ejemplo, aunque sin limitarnos, los valores control de la HbA tomados de una muestra de referencia procedente de un individuo sano se encuentran entre 13,8 y 17,2 g/dl en hombres y entre 12,1 y 15,1 g/dl en mujeres. Los valores control de la HbA_{1c} tomados de una muestra de referencia procedente de un individuo sano se encuentran ente un 2,2 y un 4,8% en individuos adultos y entre un 1,8 y un 4% en niños.

Ejemplos de enfermedades que cursan con alteraciones en los niveles de hemoglobina son, aunque sin limitarnos, anemia o, en general, cualquier tipo de hemoglobinopatía, entendiéndose por “hemoglobinopatía” el grupo de trastornos hereditarios en los cuales hay una estructura y/o producción anormal de la molécula de la hemoglobina A. Ejemplos de enfermedades que cursan con alteraciones en los niveles de HbA_{1c} son, aunque sin limitarnos, diabetes mellitus, anemia hemolítica, enfermedades renales o pérdidas de sangre crónicas. En una realización más preferida de este aspecto de la invención, la enfermedad que cursa con alteraciones en los niveles de HbA_{1c} es la diabetes mellitus.

El término “diabetes mellitus” se refiere al grupo de trastornos metabólicos que afecta a diferentes órganos y tejidos, dura toda la vida y se caracteriza por un aumento de los niveles de glucosa en la sangre (hiperglicemia) con respecto a unos valores control tomados de una muestra de referencia procedente de un individuo sano. Los valores control de los niveles de glucosa tomados de una muestra de referencia procedente de un individuo sano se encuentran entre 90 y 130 miligramos por decilitro (mg/dl) en situación de ayunas. Esta enfermedad está causada por varios trastornos, incluyendo la baja producción de la hormona insulina, secretada por las células beta pancreáticas, la ausencia o disminución significativa de la masa de células beta y/o por el aumento de la resistencia a la insulina. Los síntomas principales de la diabetes mellitus son, por ejemplo, aunque sin limitarnos, emisión excesiva de orina (poliuria), aumento anormal de la necesidad de comer (polifagia), incremento de la sed (polidipsia) o pérdida de peso sin razón aparente. Dentro de este término se incluyen los tipos de diabetes mellitus seleccionados de la lista que comprende: diabetes mellitus tipo I, diabetes mellitus tipo II, diabetes gestacional u otros tipos de diabetes mellitus.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o seguimiento de enfermedades que cursan con

alteraciones en los niveles de hemoglobina en un individuo, o “método de la invención”, que comprende:

- 5 a. cuantificar la cantidad de hemoglobina en una muestra biológica aislada de un individuo,
- b. cuantificar la cantidad de péptido de la invención en la muestra biológica aislada del paso (a), y
- c. normalizar el valor de cuantificación obtenido en el paso (a) en función del valor de cuantificación obtenido en el paso (b).

10

Una “muestra biológica aislada” incluye, aunque sin limitarse, tejidos y/o fluidos biológicos de un individuo, preferiblemente humano, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. Ejemplos de muestras biológicas aisladas que podrían ser empleadas en el método de la invención son, aunque sin limitarse, sangre, suero o plasma. Por

15 ello, en una realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica aislada del paso (a) del método de la invención es sangre.

La cuantificación de los pasos (a) y (b) del método de la invención puede

20 llevarse a cabo de manera simultánea o secuencial, aunque preferiblemente, se lleva a cabo de manera simultánea. Los métodos para cuantificar la cantidad de hemoglobina en el paso (a) y de péptido de la invención en el paso (b) del método de la invención en una muestra biológica aislada son conocidos en el estado de la técnica, incluyendo, por ejemplo, aunque sin limitarnos, ES-MS

25 (de sus siglas en inglés *Electrospray mass spectrometry*), IEF (de sus siglas en inglés *Isoelectric focusing*), electroforesis o HPLC (de sus siglas en inglés *High-Performance Liquid Chromatography*). En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la cuantificación de los pasos (a) y (b) del método de la invención se realiza mediante HPLC.

30

En una realización más preferida, la normalización del paso (c) del método de la invención se realiza sumando, al valor de cuantificación obtenido en el paso

(a), el valor de cuantificación obtenido en el paso (b). Así, se obtiene un valor correspondiente a la cantidad de hemoglobina del paso (a) que es útil para el diagnóstico y/o seguimiento de enfermedades que cursan con alteraciones en los niveles de esta hemoglobina.

5

En otra realización preferida, la hemoglobina del paso (a) del método de la invención es la HbA_{1c}. En una realización más preferida, la enfermedad es la diabetes mellitus.

- 10 La cantidad de HbA_{1c} en la muestra biológica aislada cuyo valor se obtiene con el método de la invención es de utilidad para el diagnóstico de, por ejemplo, aunque sin limitarnos, la diabetes mellitus. Por ello, cuando el valor obtenido en el paso (c) del método de la invención se encuentre entre un 2,2 y un 4,8%, se asignará al individuo del cual procede la muestra biológica aislada del paso (a)
- 15 al grupo de pacientes sanos, que no presentan diabetes mellitus.

- La cantidad de HbA_{1c} en la muestra biológica aislada cuyo valor se obtiene con el método de la invención es de utilidad para el seguimiento de un individuo previamente diagnosticado de, por ejemplo, aunque sin limitarnos, diabetes
- 20 mellitus. Por ello, cuando el valor obtenido en el paso (c) del método de la invención se encuentre entre un 4% y un 7% se asignará al individuo previamente diagnosticado de diabetes mellitus del cual procede la muestra biológica del paso (a) al grupo de pacientes de diabetes mellitus bien controlados. Cuando el valor obtenido en el paso (c) del método de la invención
- 25 se encuentre entre un 7% y un 8%, se asignará al individuo previamente diagnosticado de diabetes mellitus del cual procede la muestra biológica del paso (a) al grupo de pacientes de diabetes mellitus que requieren un mayor control. Cuando el valor obtenido en el paso (c) del método de la invención sea superior a un 8%, se asignará al individuo previamente diagnosticado de
- 30 diabetes mellitus del cual procede la muestra biológica del paso (a) al grupo de pacientes de diabetes mellitus mal controlados.

Se entiende por un "paciente de diabetes mellitus bien controlado" un individuo diabético que responde adecuadamente al tratamiento farmacológico y/o a la dieta a la que esta siendo sometido en el momento en el que se toma la muestra biológica empleada en el método de la invención. Por el contrario, un

5 "paciente de diabetes mellitus mal controlado" es un individuo diabético que, o bien no esta siendo tratado para dicha patología en el momento en que se toma la muestra biológica empleada en el método de la invención, o bien no responde adecuadamente al tratamiento y/o a la dieta a la que esta siendo sometido en ese mismo momento, por lo que en ambos casos debe tomarse

10 una decisión médica en cuanto al futuro tratamiento a administrar.

Los pasos del método de la invención pueden ser parcial o totalmente automatizados, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante un equipo bioquímico que realice la cuantificación de los pasos (a) y (b) y/o la

15 normalización del paso (c). Además, el método de la invención puede comprender otros pasos adicionales, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, relacionados con la obtención y/o preparación de la muestra biológica aislada.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus

20 variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la

25 presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 **Fig. 1.** Muestra el cromatograma de un paciente que expresa el péptido de la invención obtenido mediante HPLC.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del método de la invención en la obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o seguimiento de la diabetes mellitus en individuos que expresan el péptido de la invención. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLO 1. Normalización de los valores de expresión de la HbA_{1c} obtenidos por HPLC en presencia del péptido de la invención.

El sujeto de estudio fue un individuo varón de 61 años de edad diagnosticado de diabetes mellitus tipo II con glucemia mal controlada. Se obtuvieron muestras de sangre de este paciente y se mezclaron con EDTA como anticoagulante. El índice de glóbulos rojos, así como las demás determinaciones hematológicas, se analizaron mediante un contador de células sanguíneas automático. Los resultados del hemograma y de la bioquímica fueron los que se muestran en las tablas 1 y 2, respectivamente.

Serie blanca	Valores	Unidades
Leucocitos	7,5	$\times 10^9/l$
Linfocitos	26,9	%
Linfocitos valor absoluto	2,0	$\times 10^9/l$
Monocitos	5,1	%
Monocitos valor absoluto	0,4	$\times 10^9/l$
Neutrófilos	63,7	%
Neutrófilos valor absoluto	4,8	$\times 10^9/l$

Eosinófilos	4,1	%
Basófilos	0,2	%
Serie roja		
Hematíes	4,2	$\times 10^{12}/l$
Hemoglobina	14,0	g/dl
Hematocrito	41,2	%
Volumen corpuscular medio (VCM)	97,6	fl
Concentración HGB Corpuscular Media (HCM)	33,9	g/l
Hemoglobina Corpuscular Media	33,1	pg
Ancho Distribución Hematíes (RDW)	13,4	%
Plaquetas	204,0	$\times 10^9/l$
Volumen Plaquetar Medio	8,8	fl
Reticulocitos	1,2	%

Tabla 1. Resultados del hemograma del paciente diabético estudiado. fl: fentolitros, pg: picogramos.

Prueba	Valores	Unidades	Valores de referencia
Glucosa	219	mg/dl	70-110
Urea	41	mg/dl	10-40
Creatinina	1,06	mg/dl	0,5-1,1
Proteasas Totales	8,0	g/dl	6,5-8
GOT	38	UI/l	10-37
GPT	40	UI/l	10-40
GGT	76	UI/l	10-50
Fosfatasa alcalina	45	UI/l	40-130
Bilirrubina total	0,59	mg/dl	0,10-1,20
Sodio	142	mEq/l	135-145
Potasio	4,3	mEq/l	3,5-4,5

Perfil Lipídico			
Colesterol	138	mg/dl	150-200
Triglicéridos	105	mg/dl	70-170

Tabla 2. Resultados de la bioquímica del paciente diabético estudiado. UI/l: unidades internacionales por litro. mEq/l: miliequivalentes por litro.

- 5 Este paciente fue también sometido a un control de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) por HPLC (Turbo II, BioRad, tiempo de elución 1,5 y 3 minutos). Así, en el análisis por HPLC (HPLC intercambio catiónico) de la primera muestra tomada de este paciente se midieron la HbA₂ (2,4%) y la HbF (0%). En este mismo análisis se aisló y midió una Hb X (39,6%) que eluyó antes que la Hb A.
- 10 Además, el cromatograma obtenido mostró picos anómalos: un pequeño pico después de la HbA_{1c} y un pequeño pico después de la Hb A0 que no se distinguía con claridad. Por ello, se analizó una nueva muestra procedente del mismo paciente para descartar que dichos picos se trataran de artefactos.
- 15 En el nuevo análisis que se realizó con la muestra recién extraída del paciente se observó un pico posterior a la HbA_{1c} muy unido a ella, no conocido y que habitualmente no se observa, así como un pico delante de Hb A0 que tuvo que ser ampliado para poder observarse bien. El pico desconocido no se identificaba con ninguna hemoglobinopatía conocida en los aparatos de Bio-
- 20 Rad y no se observaba mediante el diagnóstico realizado con la tecnología Menarini. Los resultados de las Hb detectadas en este análisis se muestran en la tabla 3 y en la figura 1.

Hb correspondiente al pico	Área calibrada (%)	Área (%)	Tiempo retención (min)	Área pico
HbA _{1a}	---	0,9	0,21	26.613
HbA _{1b}	---	1,6	0,35	46.994
HbF	---	0,3	0,59	9.334
HbLA _{1c}	---	1,2	0,77	36.882

HbA _{1c}	6,4	---	1,01	117.391
Desconocida	---	2,6	1,28	77.769
HbP3	---	2,0	1,53	59.741
HbP4	---	4,4	1,62	130.791
HbA0	---	83,1	1,79	2.484.957
Área total:				2.990.472

Tabla 3. Resultados de las Hb detectadas mediante HPLC en el paciente diabético estudiado.

- 5 La HbA_{1c} se analizó también por otras técnicas que se estaban evaluando por el *Point of Care*, es decir, por afinidad de boronato y por inmunoensayo, las cuales no presentaban este tipo de interferencias, lo que ofreció un resultado de un 8,1% por afinidad de boronato (DCA, Siemens) y un 8,4% por inmunoensayo (Afinitun, IZASA) para dicha hemoglobina. Sin embargo, por el
- 10 método de HPLC 3 min, el resultado para la HbA_{1c} era de un 6,4% (con una glucemia en el paciente de alrededor de 220 mg/dl), lo que se encontraba fuera de los rangos esperados. La suma del área de los dos picos mostrados en el cromatograma (el pico desconocido correspondiente al péptido de la invención y el pico correspondiente a la HbA_{1c}) resultaba en un valor muy similar al
- 15 ofrecido por la determinación por afinidad de boronato y por inmunoensayo (6,4% + 2,6% = 9%).

EJEMPLO 2. Caracterización estructural y funcional del péptido de la invención.

20

Un estudio de HPLC en fase reversa (Separations, Group, Hesperia, EEUU) reveló la presencia de una cadena β globina anormal que fluía por delante de la cadena β^A (β^x , β^A y α^A). La estabilidad de la nueva hemoglobina, medida mediante un test de isopropanol, era normal y los estudios de unión de oxígeno

25 (Hemox Analyzer) mostraron afinidad normal por el oxígeno de toda la sangre (P_{50} de 25 mmHg).

Para la caracterización molecular de esta nueva variante de la hemoglobina, el ADN genómico de los leucocitos se extrajo automáticamente con Bio-Robot EZ1 (Quiagen). La amplificación selectiva del gen β se llevó a cabo por PCR mediante Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler. Posteriormente, se llevó a

5 cabo la secuenciación de este gen en ambas direcciones en un secuenciador automático (3.77 ABI, Applied Biosystems, CA), lo que mostró una sustitución de CTC por TTC en el codon 81. Esta mutación producía un cambio de una Leu por una Phe en la posición 81 de la β globina.

- 10 Ni la función ni la estabilidad de esta nueva variante de la hemoglobina se encontraba alterada, ya que la mutación que la codifica consiste en el cambio de un aminoácido apolar hidrofóbico (Leu) por otro de las mismas características (Phe), en la posición 5 de la hélice EF (esta posición en 3D corresponde al sitio de unión del 2,3-DPG).

15

20

25

30

REIVINDICACIONES

1. Péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:
1.
5
2. Uso del péptido según la reivindicación 1 para la obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o seguimiento de enfermedades que cursan con alteraciones en los niveles de hemoglobina.
- 10 3. Uso del péptido según la reivindicación 2 donde la hemoglobina es la HbA_{1c}.
4. Uso del péptido según la reivindicación 3 donde la enfermedad es la diabetes mellitus.
15
5. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico y/o seguimiento de enfermedades que cursan con alteraciones en los niveles de hemoglobina en un individuo que comprende:
20
 - a. cuantificar la cantidad de hemoglobina en una muestra biológica aislada de un individuo,
 - b. cuantificar la cantidad de péptido según la reivindicación 1 en la muestra biológica aislada del paso (a), y
 - c. normalizar el valor de cuantificación obtenido en el paso (a) en función
25 del valor de cuantificación obtenido en el paso (b).
6. Método según la reivindicación 5 donde la cuantificación de los pasos (a) y (b) se realiza mediante HPLC.
- 30 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6 donde la normalización del paso (c) se realiza sumando, al valor de cuantificación obtenido en el paso (a), el valor de cuantificación obtenido en el paso (b).

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 donde la hemoglobina del paso (a) es la HbA_{1c}.
9. Método según la reivindicación 8 donde la enfermedad es la diabetes mellitus.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 donde la muestra biológica aislada del paso (a) es sangre.

1/1

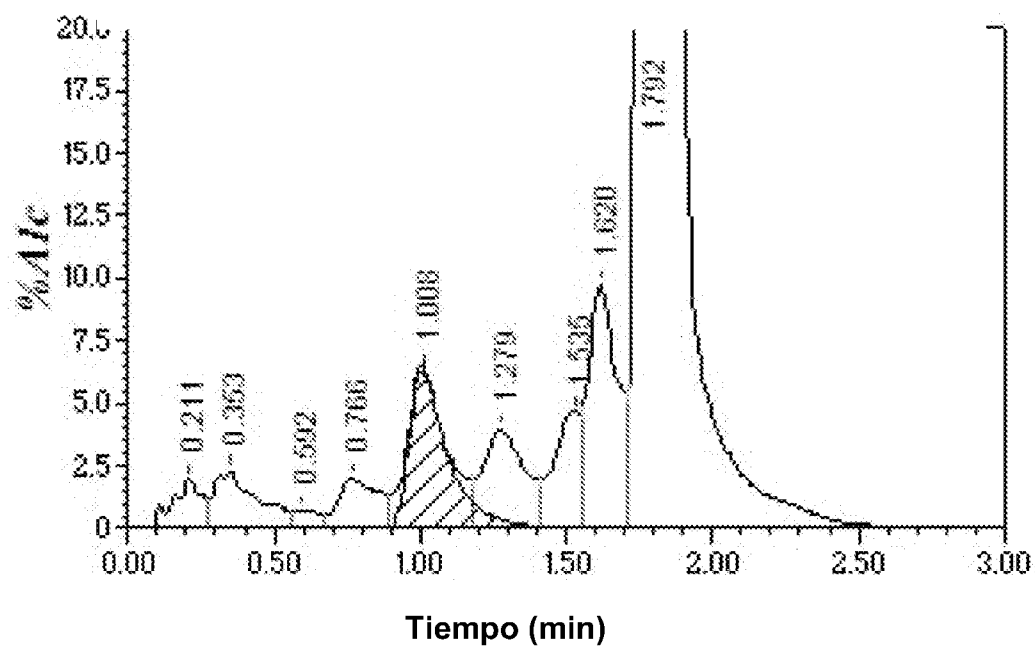


FIG. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2011/070411

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K14/805 (2006.01)

G01N33/72 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K, G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EMBL-EBI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LITTLE, R.R. et al., 'A review of variant hemoglobins interfering with hemoglobin A1c measurement', JOURNAL OF DIABETES SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2009, Vol. 3, No. 3, pages 446-451, ISSN: 1932-2968 (Electronic), the whole document.	1-10
A	LITTLE, R.R. et al., 'Effects of hemoglobin (Hb) E and HbD traits on measurements of glycated Hb (HbA1c) by 23 methods', CLINICAL CHEMISTRY, 2008, Vol. 54, No. 8, Pages 1277-1282, ISSN: 0009-9147, the whole document.	1-10
A	SAUDEK, C.D. et al., 'A new look at screening and diagnosing diabetes mellitus', JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM, 2008, Vol. 93, No. 7, pages 2447-2453, ISSN: 0021-972X, the whole document.	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14/11/2011

Date of mailing of the international search report
(17/11/2011)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
J. Vizán Arroyo

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498573

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2011/070411

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LEE, S.T. et al., 'Effects of 7 hemoglobin variants on the measurement of glycohemoglobin by 14 analytical methods', CLINICAL CHEMISTRY, 2007, Vol. 53, No. 12, pages 2202-2205, ISSN: 0009-9147, the whole document.	1-10
A	SACKS, D.B., 'Hemoglobin variants and hemoglobin A1c analysis: problem solved?', CLINICAL CHEMISTRY, 2003, Vol. 49, No. 8, pages 1245-1247, ISSN: 0009-9147, the whole document.	1-10
A	BRY, L. et al., 'Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin', CLINICAL CHEMISTRY, 2001, Vol. 47, No. 2, pages 153-163, ISSN: 0009-9147, the whole document.	1-10
A	WO 00/70350 A1 (CME TELEMETRIX INC.) 23-11-2000, the whole document.	1-10
P,X	HERRERA del REY, T. et al., 'Hemoglobin Seville [$\alpha 2 \beta 2$ 81(EF5) Leu→Phe] a silent phenotypic variant that interferes in hemoglobin A1c measurement by ion-exchange HPLC method', CLINICAL BIOCHEMISTRY, 2011 Jul, Vol. 44, Nos. 10-11, pages 933-935, ISSN: 0009-9120, Epub : 29-04-2011, the whole document.	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2011/070411

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO0070350 A	23.11.2000	US2002110496 A	15.08.2002
		US6841132 B	11.01.2005
		US6582964 B	24.06.2003
		US2005170522 A	04.08.2005
		US7108833 B	19.09.2006
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2011/070411

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K14/805 (2006.01)

G01N33/72 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EMBL-EBI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	LITTLE, R.R. et al., 'A review of variant hemoglobins interfering with hemoglobin A1c measurement', JOURNAL OF DIABETES SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2009, Vol. 3, No. 3, páginas 446-451, ISSN: 1932-2968 (Electronic), todo el documento.	1-10
A	LITTLE, R.R. et al., 'Effects of hemoglobin (Hb) E and HbD traits on measurements of glycated Hb (HbA1c) by 23 methods', CLINICAL CHEMISTRY, 2008, Vol. 54, No. 8, Páginas 1277-1282, ISSN: 0009-9147, todo el documento.	1-10
A	SAUDEK, C.D. et al., 'A new look at screening and diagnosing diabetes mellitus', JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM, 2008, Vol. 93, No. 7, páginas 2447-2453, ISSN: 0021-972X, todo el documento.	1-10

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
14/11/2011

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
17 de noviembre de 2011 (17/11/2011)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
N° de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
J. Vizán Arroyo
N° de teléfono 91 3498573

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070411

C (Continuación).			DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº	
A	LEE, S.T. et al., 'Effects of 7 hemoglobin variants on the measurement of glycohemoglobin by 14 analytical methods', CLINICAL CHEMISTRY, 2007, Vol. 53, No. 12, páginas 2202-2205, ISSN: 0009-9147, todo el documento.	1-10	
A	SACKS, D.B., 'Hemoglobin variants and hemoglobin A1c analysis: problem solved?', CLINICAL CHEMISTRY, 2003, Vol. 49, No. 8, páginas 1245-1247, ISSN: 0009-9147, todo el documento.	1-10	
A	BRY, L. et al., 'Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin', CLINICAL CHEMISTRY, 2001, Vol. 47, No. 2, páginas 153-163, ISSN: 0009-9147, todo el documento.	1-10	
A	WO 00/70350 A1 (CME TELEMETRIX INC.) 23-11-2000, todo el documento.	1-10	
P,X	HERRERA del REY, T. et al., 'Hemoglobin Seville [$\alpha 2 \beta 2$ 81(EF5) Leu→Phe] a silent phenotypic variant that interferes in hemoglobin A1c measurement by ion-exchange HPLC method', CLINICAL BIOCHEMISTRY, 2011 Jul, Vol. 44, Nos. 10-11, páginas 933-935, ISSN: 0009-9120, Epub : 29-04-2011, todo el documento.	1-10	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070411

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO0070350 A	23.11.2000	US2002110496 A	15.08.2002
		US6841132 B	11.01.2005
		US6582964 B	24.06.2003
		US2005170522 A	04.08.2005
		US7108833 B	19.09.2006
-----	-----	-----	-----