

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 287**

51 Int. Cl.:

G01N 33/72 (2006.01)

G01N 33/96 (2006.01)

A61B 5/145 (2006.01)

A61B 5/1495 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2020** **PCT/US2020/014014**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2020** **WO20167411**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2020** **E 20756600 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2024** **EP 3923806**

54 Título: **Calibradores y controles para la determinación del porcentaje de hemoglobina glicosilada en una muestra de prueba líquida de un paciente**

30 Prioridad:

15.02.2019 US 201962806163 P

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

21.08.2024

73 Titular/es:

SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)

511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591, US

72 Inventor/es:

HIXSON, CRAIG

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 977 287 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

Calibradores y controles para la determinación del porcentaje de hemoglobina glicosilada en una muestra de prueba líquida de un paciente

5

Campo técnico de la invención

10

El (los) concepto(s) inventivo(s) actualmente divulgado(s) y reivindicado(s) está(n) relacionado(s) con el (los) método(s) que dispensa(n) al menos un líquido, incluyendo, pero sin limitarse a, al menos un reactivo líquido y/o amortiguador, para la realización de al menos un ensayo de diagnóstico. Más concretamente, el concepto o conceptos inventivos divulgados y reivindicados se refieren a un método para preparar un sistema de calibración que comprenda al menos dos calibradores para su uso en un instrumento de ensayo de detección de analitos y un método para calibrar al menos un ensayo de diagnóstico.

15

Antecedentes de la invención

20

Existen numerosos dispositivos y métodos para detectar los analitos que pueden estar presentes en una muestra de fluido. Dichos dispositivos han demostrado su eficacia en ensayos de diagnóstico que detectan la presencia y la cantidad de determinados analitos indicativos de la salud de un paciente, incluyendo, pero sin limitarse a, hemoglobina total, hemoglobina glicosilada (HbA1c), microalbúmina y creatinina, así como analitos basados en lípidos, tales como colesterol, triglicéridos y/o lipoproteínas de alta densidad.

25

La medición del porcentaje de hemoglobina glicosilada presente en la muestra de sangre de un paciente es indicativa de la concentración promedio de glucosa plasmática presente en la sangre del paciente durante un periodo aproximado de los tres meses anteriores. A medida que aumenta la cantidad promedio de glucosa plasmática, al menos una parte de la hemoglobina de la sangre del paciente se convierte no enzimáticamente en hemoglobina glicosilada, lo que provoca un aumento del porcentaje o fracción de HbA1c presente en la sangre del paciente (en comparación con la cantidad total de hemoglobina presente en la sangre del paciente).

30

US 2007/0224685 A1 divulga un método para medir la hemoglobina A1c y calcular el cociente de hemoglobina A1c. En el método se emplean dos sustancias estándar para la medición de HbA1c: JDS HbA1c nivel 1, con un valor de 4,04% de Hb glicosilada, con base en la Hb total, y JDS HbA1c nivel 5, con un valor de 12,63%, con base en la Hb total. El primer calibrador tiene un valor de HbA1c superior al límite inferior (3,9%, basado en la hemoglobina total). En el método para medir la tasa de glicación de la hemoglobina que se enseña en WO 2018/101389 A1, pueden emplearse calibradores con dos relaciones HbA1c diferentes: una concentración baja del 3 - 7% y una concentración alta del 10 - 20%, en cada caso basadas en la concentración total de hemoglobina.

35

40

WO 92/22818 A1 enseña una prueba para la hemoglobina glicosilada utilizando un método de unión por afinidad sin equilibrio. En la prueba se emplean calibradores que contienen azido-met-hemoglobina glicosilada reducida con niveles de glicosilación en los rangos de 0 - 8%, 8 - 16% y 16 - 30% de HbA1c, en cada caso basados en la hemoglobina total. EP 1 314 982 A1 y EP 1 304 571 A1 divulgan inmunoensayos en los que partículas portadoras insolubles son capaces de unir sustancias antigénicas. Las curvas de calibración se obtienen con muestras estándar que tienen valores de HbA1c del 0,0%, 4,2%, 7,7%, 11,3% y 14,8%, basados en la hemoglobina total.

45

El objeto de US 2011/000788 A1 es un ensayo para la determinación de la hemoglobina A glicosilada. Para aumentar la precisión del ensayo, se utilizan al menos dos calibradores, uno con una concentración alta conocida de HbA1c y otro con una concentración baja conocida de HbA1c. US 6 043 043 A se refiere a un método para determinar la hemoglobina glicosilada. La medición de la hemoglobina glicosilada y la cantidad total de hemoglobina se normalizan a continuación para obtener una concentración corregida de HbA1c. Se genera una curva estándar con 6 calibradores que tienen diferentes porcentajes de HbA1c pero la misma concentración de hemoglobina total para la normalización. Los calibradores contenían 2,5%, 5,9%, 7,9%, 10,97% y 12,54% de HbA1c.

50

55

Sin embargo, cuando se realizan ensayos de diagnóstico para detectar la presencia y/o la concentración de al menos un analito de interés (por ejemplo, a modo de ejemplo, la hemoglobina glicosilada (HbA1c)), los instrumentos de medición deben calibrarse para garantizar que los resultados obtenidos sean precisos. Cuando el analito de interés es la hemoglobina glicosilada, puede resultar muy difícil construir calibradores que detecten tanto niveles extremadamente bajos (es decir, inferiores a aproximadamente un 4% de hemoglobina glicosilada) como niveles extremadamente altos (es decir, superiores a aproximadamente un 12% de hemoglobina glicosilada) de HbA1c presentes en la muestra de prueba líquida de un paciente (tal como, a modo de ejemplo, la muestra de sangre entera de un paciente). Actualmente, es habitual buscar pacientes cuyas muestras de sangre contengan los niveles deseados (tanto concentraciones bajas como altas) de hemoglobina glicosilada. Una vez encontradas, se toman muestras de sangre de este grupo demográfico de pacientes y se utilizan para establecer los umbrales superior e inferior de los calibradores que detectan tanto la hemoglobina total como el porcentaje de hemoglobina glicosilada.

60

65

Aunque resulta eficaz para establecer los umbrales bajo y alto de los calibradores de diagnóstico, a menudo es muy difícil, si no imposible, encontrar un número adecuado de pacientes cuyas muestras de sangre contengan las concentraciones

bajas y altas de hemoglobina glicosilada necesarias para optimizar los umbrales de calibración. En consecuencia, existe la necesidad de métodos mejorados que produzcan calibradores de ensayos de diagnóstico que abarquen el rango de ensayos clínicos del porcentaje de hemoglobina glicosilada desde muy bajo (es decir, menor o igual a aproximadamente 3%) hasta muy alto (es decir, mayor o igual a aproximadamente 18%). Es a tales métodos, así como a los dispositivos y kits relacionados con los mismos, a los que se dirige el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados.

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona un método para preparar un sistema de calibración que comprende al menos dos calibradores para su uso en un instrumento de ensayo de detección de analitos de conformidad con la reivindicación 1 y un método para calibrar al menos un ensayo de diagnóstico de conformidad con la reivindicación 4.

Descripción de las distintas vistas de los dibujos

La FIG. 1 es un diagrama esquemático de las subunidades de hemoglobina conjugadas con glucosa.
La FIG. 2 es un diagrama de flujo de una realización no limitativa de una metodología para producir y/o preparar un calibrador de hemoglobina altamente glicosilada de acuerdo con el (los) concepto(s) inventivo(s) actualmente divulgado(s) y/o reivindicado(s).
La FIG. 3 es un diagrama de flujo de una realización no limitativa de una metodología para producir y/o preparar un calibrador de hemoglobina altamente glicosilada mediante la eliminación del hemo de la hemoglobina de acuerdo con el (los) concepto(s) inventivo(s) actualmente divulgado(s) y/o reivindicado(s).
La FIG. 4 es un diagrama de flujo de una realización no limitativa de una metodología para producir y/o preparar un calibrador de hemoglobina altamente glicosilada utilizando un sustrato sintético de fructosil-péptido de acuerdo con el (los) concepto(s) inventivo(s) actualmente divulgado(s) y/o reivindicado(s).
La FIG. 5 es un diagrama de flujo de una realización no limitativa de una metodología para producir y/o preparar un calibrador de hemoglobina reducida y/o de baja glicosilación mediante la modificación química de la hemoglobina glicosilada por un periodato de acuerdo con el (los) concepto(s) inventivo(s) actualmente divulgado(s) y/o reivindicado(s).
La FIG. 6 es un diagrama de flujo de una realización no limitativa de una metodología para producir y/o preparar un calibrador de hemoglobina reducida y/o de baja glicosilación mediante la utilización de una enzima en fase sólida de acuerdo con el (los) concepto(s) inventivo(s) actualmente divulgado(s) y/o reivindicado(s).
La FIG. 7 es un espectro de absorbancia de un tinte asociado con una realización no limitativa de una metodología para producir y/o preparar un calibrador de hemoglobina reducida y/o de baja glicosilación mediante la utilización de al menos un tinte de acuerdo con el (los) concepto(s) inventivo(s) actualmente divulgado(s) y/o reivindicado(s).
La FIG. 8 es una lista no exhaustiva de secuencias de aminoácidos N-terminales para humanos y varias subunidades β de hemoglobina animal asociadas con una realización no limitativa de una metodología para producir y/o preparar un calibrador de hemoglobina reducida y/o de baja glicosilación mediante el mezclado de sangre humana y la sangre de al menos un animal de acuerdo con el (los) concepto(s) inventivo(s) actualmente divulgado(s) y/o reivindicado(s).

Descripción detallada

Antes de explicar al menos una realización de los conceptos inventivos en detalle por medio de dibujos, experimentación, resultados, y procedimientos de laboratorio ejemplares, se va a entender que los conceptos inventivos no se limitan en su aplicación a los detalles de construcción y el arreglo de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos, experimentación y/o resultados. El (los) presente(s) concepto(s) es (son) capaz(es) de tener otras realizaciones, o de ser practicado(s) o llevado(s) a cabo de diversas maneras. Como tal, el lenguaje utilizado en la presente pretende tener el alcance y significado más amplio posible; y las realizaciones pretenden ser ejemplares, no exhaustivas. Asimismo, debe entenderse que la fraseología y terminología empleada en la presente tiene como finalidad la descripción y no debe considerarse como limitativa.

A menos que se defina lo contrario en la presente, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con el (los) concepto(s) inventivo(s) actualmente divulgado(s) y reivindicado(s) tendrán los significados que son comúnmente entendidos por los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto exija lo contrario, los términos singulares incluirán las pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan generalmente de acuerdo con los métodos convencionales bien conocidos en la técnica, y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, la química analítica, la química orgánica sintética, y la química medicinal y farmacéutica descrita en la presente son aquellas que son bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica.

Todas las patentes, solicitudes de patente publicadas, y publicaciones que no son patentes mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de habilidad de los expertos en la materia a la cual pertenece(n) el (los) concepto(s) inventivo(s) actualmente divulgado(s) y reivindicado(s).

Todos los métodos divulgados y reivindicados en la presente se pueden ejecutar sin experimentación indebida a la luz de la presente divulgación. En tanto que los métodos se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será evidente

para aquellos expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones a los métodos y en los pasos o en la secuencia de pasos del método descrito en la presente sin apartarse del alcance del (de los) concepto(s) inventivo(s) actualmente divulgado(s) y reivindicado(s). Todos estos sustitutos similares y modificaciones evidentes para aquellos expertos en la técnica se considera que están dentro del alcance de los conceptos inventivos como se definen en las reivindicaciones anexas.

De la manera que se utilizan de acuerdo con la presente divulgación, se entenderá que los siguientes términos tienen los siguientes significados, a menos que se indique lo contrario:

El uso de la palabra “un” o “una” cuando se utiliza junto con el término “que comprende” en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar “uno/a”, pero también es consistente con el significado de “uno/a o más”, “al menos uno/a” y “uno/a o más de uno/a”. Las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a “un compuesto” puede referirse a 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, o un número mayor de compuestos. El término “pluralidad” se refiere a “dos o más.” El uso del término “o” en las reivindicaciones se utiliza para significar “y/o” salvo que se indique explícitamente que se refiere solamente a alternativas o las alternativas se excluyen mutuamente, aunque la divulgación soporta una definición que se refiere sólo a alternativas y a “y/o”. A lo largo de esta solicitud, el término “aproximadamente” se utiliza para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el método que se emplea para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos de estudio. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, cuando se utiliza el término “aproximadamente”, el valor designado puede variar en $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, o $\pm 5\%$, o $\pm 1\%$, o $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para llevar a cabo los métodos divulgados y como lo entienden los expertos en la técnica. El uso del término “al menos uno” se entenderá que incluye uno, así como cualquier cantidad más de uno, incluyendo, pero sin limitarse a, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, etc. El término “al menos uno” puede extenderse hasta 100, 1000 o más, dependiendo del término al que se le adjunte; además, las cantidades de 100/1000 no deben considerarse limitativa, ya que los límites más altos también pueden producir resultados satisfactorios. Además, se entenderá que el uso del término “al menos uno de X, Y y Z” incluye sólo X, sólo Y y sólo Z, así como cualquier combinación de X, Y, Y y Z. El uso de la terminología de números ordinales (es decir, “primero”, “segundo”, “tercero”, “cuarto”, etc.) es únicamente con el propósito de diferenciar entre dos o más elementos y no pretende implicar ninguna secuencia, orden o importancia para un elemento sobre otro, o cualquier orden de adición, por ejemplo.

Como se utiliza en esta memoria descriptiva y reivindicaciones, los términos “que comprende” (y cualquier forma de que comprende, tal como “comprenden” y “comprende”), “que tiene” (y cualquier forma de que tiene, tal como “tienen” y “tiene”), “que incluye” (y cualquier forma de que incluye, tal como “incluyen” e “incluye”) o “que contiene” (y cualquier forma de que contiene, tal como “contienen” y “contiene”), son inclusivas o abiertas y no excluyen pasos de método o elementos adicionales no citados.

El término “o combinaciones de los mismos” como se usa en la presente se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos enumerados que preceden al término. Por ejemplo, “A, B, C, o combinaciones de los mismos” pretende incluir al menos uno de los siguientes elementos: A, B, C, AB, AC, BC, o ABC, y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC, o CAB. Continuando con este ejemplo, se incluyen expresamente combinaciones que contienen repeticiones de uno o más elementos o términos, tales como BB, AAA, AAB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, etc. El experto en la técnica entenderá que normalmente no hay límite en el número de elementos o términos en cualquier combinación, a menos que se deduzca lo contrario del contexto.

Como se utiliza en la presente, el término “sustancialmente” significa que el evento o circunstancia descrito posteriormente ocurre completamente, o que el evento o circunstancia descrito posteriormente ocurre en gran medida o grado. Por ejemplo, el término “sustancialmente” significa que el evento o circunstancia descrito posteriormente se produce al menos 90% del tiempo, o al menos 95% del tiempo, o al menos 98% del tiempo.

Como se utiliza en la presente, la frase “asociado con” incluye tanto la asociación directa de dos fracciones entre sí como la asociación indirecta de dos fracciones entre sí. Entre los ejemplos no limitativos de asociaciones se incluyen la unión covalente de una fracción a otra, ya sea mediante una unión directa o a través de un grupo espaciador, la unión no covalente de una fracción a otra, ya sea directamente o mediante miembros de pares de unión específicos unidos a las fracciones, la incorporación de una fracción a otra, tal como, por ejemplo, disolviendo un resto en otro o mediante síntesis, y el recubrimiento de un resto sobre otro resto.

El término “analito(s) de interés”, como se utiliza en la presente, se refiere a un analito seleccionado del grupo formado por la hemoglobina total, la hemoglobina glicosilada y combinaciones de las mismas.

El término “muestra líquida de prueba”, tal como se utiliza en la presente, significa sangre entera. Tal como se utiliza en la presente, el término “volumen” en relación con la muestra de prueba líquida utilizada de acuerdo con el concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y reivindicados significa desde aproximadamente 0,1 microlitros hasta aproximadamente 100 microlitros, o desde aproximadamente 1 microlitro hasta aproximadamente 75 microlitros, o desde aproximadamente 2 microlitros hasta aproximadamente 60 microlitros, o menos de o igual a aproximadamente 50 microlitros.

El término "paciente" incluye sujetos humanos y veterinarios. En ciertas realizaciones, el paciente es un mamífero. En ciertas otras realizaciones, el paciente es un humano. A efectos de tratamiento, "mamífero" se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluidos los animales humanos, domésticos y de granja, los primates no humanos y los animales de zoológico, deportivos o de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc.

Pasando ahora a las realizaciones particulares, los conceptos inventivos divulgados y reivindicados se refieren a métodos para dispensar al menos dos reactivos líquidos para su uso en ensayos de detección de analitos. Más concretamente, un aparato modificado presente dentro de un casete de reacción es capaz de dispensar al menos dos reactivos líquidos para su uso en ensayos de detección de analito(s).

Se contempla que prácticamente cualquier reactivo utilizado en los campos de los análisis y ensayos biológicos, químicos o bioquímicos podría utilizarse en los métodos del (de los) concepto(s) inventivo(s) actualmente reivindicado(s) y divulgado(s). Se contempla que estos reactivos pueden sufrir cambios físicos y/o químicos cuando se unen a un analito de interés, por lo que la intensidad, naturaleza, frecuencia o tipo de señal generada por el complejo reactivo-analito es directamente proporcional o inversamente proporcional a la concentración del analito existente dentro de la muestra de fluido. Estos reactivos pueden contener indicadores en forma de tintes, metales, enzimas, polímeros, anticuerpos e ingredientes y/o productos químicos electroquímicamente reactivos que, al reaccionar con un analito o analitos de interés, pueden mostrar un cambio de color.

En los métodos puede utilizarse cualquier método de detección y medición del analito en una muestra de prueba líquida. En la técnica se conocen diversos ensayos para detectar analitos e incluyen, pero no se limitan a, ensayos químicos, ensayos de inhibición enzimática, tinciones de anticuerpos, aglutinación de látex, inhibición de aglutinación de látex e inmunoensayos, tales como, radioinmunoensayos, inmunoensayos quimioluminiscentes, inmunoensayos electroquimioluminiscentes, inmunoensayos enzimáticos y fluoroinmunoensayos. El término "anticuerpo" se utiliza en la presente en el sentido más amplio y se refiere, por ejemplo, a anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y a fragmentos de anticuerpos que presentan la actividad biológica deseada (por ejemplo, unión a antígeno/analito). El anticuerpo puede ser de cualquier tipo o clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, e IgA), o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2).

Aunque los inmunoensayos (incluidos, entre otros, los inmunoensayos químicos y analíticos secuenciales) pueden utilizarse para la detección de al menos un analito de interés presente en una muestra de prueba líquida, un experto en la técnica comprenderá fácilmente que los conceptos inventivos divulgados y reivindicados no se limitan estrictamente a los inmunoensayos y pueden incluir, a modo de ejemplo y no como limitación, ensayos químicos y basados en productos químicos, ensayos de ácidos nucleicos, ensayos basados en lípidos y ensayos basados en serología. Los inmunoensayos, incluidos los radioinmunoensayos y los inmunoensayos ligados a enzimas, son métodos útiles para su uso con los conceptos inventivos actualmente reivindicados y divulgados. En los métodos de la invención pueden utilizarse diversos formatos de inmunoensayo, incluidos, por ejemplo, formatos de inmunoensayo competitivos y no competitivos, ensayos de captura de antígeno/analito, y ensayos de tipo sándwich de dos anticuerpos. Los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) y los métodos de afinidad por fenilboronato pueden utilizarse también en los conceptos inventivos actualmente reivindicados y divulgados. En el caso de un inmunoensayo enzimático, se suele conjugar una enzima con al menos un anticuerpo, generalmente por medio de glutaraldehído, periodato, agentes reticulantes heterobifuncionales, o complejos de biotina-estreptavidina. Sin embargo, como se reconocerá fácilmente, existe una amplia variedad de técnicas de conjugación diferentes que están fácilmente disponibles para su uso con el concepto o conceptos inventivos divulgados y reivindicados en la actualidad para un experto en la técnica.

Pueden desarrollarse ensayos, incluyendo, pero sin limitarse a, inmunoensayos, ensayos de captura de ácidos nucleicos, ensayos basados en lípidos y ensayos basados en serología, para un panel multiplexado de proteínas, péptidos, lípidos, fármacos y ácidos nucleicos que pueden estar contenidos en una muestra de prueba líquida, entre los que se incluyen, por ejemplo, pero no a modo de limitación, albúmina, microalbúmina, colesterol, triglicéridos, lipoproteínas de alta densidad, lipoproteínas de baja densidad, hemoglobina, mioglobina, α -1-microglobina, inmunoglobulinas, enzimas, proteínas, glucoproteínas, inhibidores de proteasa, fármacos, citocinas, creatinina y glucosa. Los dispositivos, kits y métodos divulgados y/o reivindicados en la presente pueden utilizarse para el análisis de cualquier muestra de fluido, incluyendo, sin limitación, sangre entera, plasma, suero u orina.

La hemoglobina glicosilada (Hb1Ac) es una forma de hemoglobina que se mide principalmente para identificar la concentración promedio de glucosa presente en la muestra de prueba líquida de un paciente (por ejemplo, en un caso, la muestra de sangre entera de un paciente) durante un periodo de tiempo. La hemoglobina glicosilada se forma mediante un mecanismo no enzimático que es el resultado de la exposición de la hemoglobina a la glucosa plasmática. A medida que la cantidad promedio de glucosa aumenta con el tiempo, el porcentaje de hemoglobina glicosilada también aumenta. Esta relación permite que la hemoglobina glicosilada actúe como marcador del nivel promedio de glucosa en sangre de un paciente durante un periodo (normalmente) de dos a tres meses antes de la recolección de la muestra de hemoglobina. Para los individuos sin diabetes mellitus, el rango normal de hemoglobina glicosilada es inferior a aproximadamente el 5,6% del recuento total de hemoglobina. Los niveles de hemoglobina glicosilada superiores al 5,6% e inferiores a aproximadamente el 6,4% del recuento total de hemoglobina son indicativos de un mayor riesgo de diabetes, mientras que los niveles de hemoglobina glicosilada superiores a aproximadamente el 6,4% del recuento total de hemoglobina sugieren la presencia de diabetes. Debido a la gravedad de las complicaciones causadas por la presencia de diabetes,

es clínicamente deseable controlar los niveles de hemoglobina glicosilada a menos de aproximadamente el 7% del recuento total de hemoglobina en un paciente que padezca esta enfermedad. El uso de la hemoglobina glicosilada como criterio de diagnóstico de la diabetes y la prediabetes ofrece varias ventajas en comparación con los niveles de glucosa plasmática en ayunas o la sobrecarga oral de glucosa, incluyendo: (i) un mejor índice de la exposición glucémica global; (ii) una mayor estabilidad estructural; y (iii) una menor variabilidad causada, por ejemplo, por el estado prandial y/o el estrés agudo.

La hemoglobina glicosilada es una molécula de proteína en la que el residuo N-terminal de valina de la subunidad β de la hemoglobina ha sido modificado por la glucosa en sangre. Como se muestra con más detalle en la FIGURA 1, esta modificación es el resultado de, por ejemplo, la reacción no enzimática de la glucosa con grupos α libres, procediendo a través de un intermediario de base de Schiff (aldimina) para producir un producto de cetoamina relativamente estable.

Los ensayos que miden la hemoglobina glicosilada presente en la muestra de sangre de un paciente requieren una calibración periódica para garantizar que los resultados obtenidos sean clínicamente precisos. Los calibradores son materiales estándar o de referencia con una concentración conocida que se utilizan para normalizar o calibrar un procedimiento de diagnóstico y/o un instrumento. Los materiales de control se emplean para garantizar que el procedimiento de ensayo de diagnóstico y/o la instrumentación funcionan correctamente.

Los calibradores y/o los materiales de calibración se suelen utilizar a intervalos de tiempo predefinidos y cuando se producen cambios y/o alteraciones en la instrumentación del ensayo de diagnóstico, tal como, a modo de ejemplo únicamente, durante el mantenimiento de los instrumentos, cuando se cambian los lotes de reactivos o siempre que los resultados obtenidos del ensayo o ensayos de diagnóstico parezcan cuestionables y/o fuera del rango clínico. El rendimiento de un ensayo de diagnóstico para identificar un analito o analitos de interés puede controlarse y/o calcularse analizando el calibrador o los calibradores y/o el material o los materiales de calibración y comparando después los valores observados obtenidos de la muestra de prueba con los valores conocidos del (de los) calibrador(es) y/o material(es) de calibración. Los valores conocidos están representados por un rango de valores aceptables y/o límites superior y/o inferior para el (los) calibrador(es) y/o el (los) material(es) de calibración. Cuando los valores obtenidos de la muestra de prueba líquida de un paciente resultantes de la realización de al menos un ensayo de diagnóstico caen dentro de los límites de control, un usuario puede estar seguro de que los resultados obtenidos del método analítico y/o ensayo de diagnóstico funciona correctamente. Sin embargo, cuando los resultados observados caen fuera de los límites de control, se debe alertar al usuario de que los resultados analíticos obtenidos pueden ser inexactos. Al preparar los calibradores, los materiales de calibración y los controles, dichos calibradores, materiales de calibración y controles deben tener una composición lo más parecida posible a la de las muestras que se van a ensayar, ya que se emplean para controlar la fiabilidad de un procedimiento o procedimientos de diagnóstico y/o de un instrumento o instrumentos y para minimizar, si no eliminar, la notificación de resultados incorrectos de las pruebas.

Como ya se ha mencionado en la presente, un aspecto del (de los) concepto(s) inventivo(s) actualmente divulgado(s) y/o reivindicado(s) implica tanto un método o métodos mejorados para preparar calibradores, materiales de calibración y/o controles para la determinación del porcentaje de hemoglobina glicosilada presente en la muestra de prueba líquida de un paciente, así como métodos mejorados de calibración. Dichos calibradores mejorados y los métodos relacionados con ellos permiten calibrar procedimientos de ensayo de diagnóstico y/o instrumentación que abarcan el ensayo clínico del porcentaje de hemoglobina glicosilada desde muy bajo (tal como, a modo de ejemplo únicamente, inferior o igual a aproximadamente 3% de hemoglobina glicosilada) hasta muy alto (tal como, a modo de ejemplo únicamente, superior o igual a aproximadamente 18% de hemoglobina glicosilada).

En una realización no limitativa de los conceptos inventivos divulgados y/o reivindicados, el porcentaje de hemoglobina glicosilada presente en la muestra líquida de prueba de un paciente se calcula tomando al menos dos mediciones de ensayo diagnóstico de la muestra líquida de prueba de un paciente, por ejemplo, la concentración de hemoglobina total y la concentración de hemoglobina glicosilada. El porcentaje de hemoglobina glicosilada se calcula como el cociente de la concentración de hemoglobina glicosilada dividido por la concentración de hemoglobina total multiplicado por 100%.

Para calcular el porcentaje de hemoglobina glicosilada en la muestra líquida de prueba de un paciente, deben determinarse las concentraciones de hemoglobina total y de los componentes de la hemoglobina glicosilada. Por consiguiente, un aspecto del (de los) concepto(s) inventivo(s) actualmente divulgado(s) y/o reivindicado(s) comprende y/o consiste en la creación y/o preparación de calibradores, materiales de calibración y/o controles, así como métodos relacionados con los mismos, para la calibración y el cálculo de la hemoglobina total y/o la hemoglobina glicosilada.

Realizaciones no limitativas del (de los) concepto(s) inventivo(s) divulgado(s) actualmente para la preparación de calibradores, materiales de calibración y/o materiales de control para calibrar niveles elevados de hemoglobina glicosilada porcentual.

Como se muestra en la FIGURA 2, en una realización no limitativa del (de los) concepto(s) inventivo(s) actualmente divulgado(s) y/o reivindicado(s), la hemoglobina glicosilada presente en una muestra de sangre *ex vivo* o la hemoglobina parcial o totalmente purificada se hace reaccionar con una concentración elevada de glucosa exógena (es decir, mayor que igual a aproximadamente 200 mM de glucosa) para producir, por ejemplo, una base intermedia de Schiff. La base intermedia de Schiff se reduce posteriormente mediante un agente reductor (tal como, a modo de ejemplo únicamente,

borohidruro sódico y/o cianoborohidruro sódico) para producir una cantidad y/o concentración elevada de hemoglobina glicosilada, incluyendo, sin limitación, hasta aproximadamente 25% de hemoglobina glicosilada. A continuación, el material que contiene la concentración elevada de hemoglobina glicosilada se suplementa en sangre humana para aumentar la concentración de hemoglobina glicosilada que se utiliza para establecer el umbral superior de hemoglobina glicosilada en un (unos) calibrador(es), material(es) de calibración y/o control(es).

En otra realización no limitativa del concepto o conceptos inventivos divulgados y/o reivindicados, y como se muestra en la FIGURA 3, la estructura proteica de la hemoglobina comprende cuatro subunidades (dos α y dos β) cada una de las cuales contiene un átomo de hierro unido a un grupo hemo (un compuesto coloreado que contiene hierro de la clase de las porfirinas que forman la parte no proteica de la hemoglobina). Se produce apohemoglobina humana (la apoproteína de la hemoglobina, es decir, la porción polipeptídica de la proteína hemoglobina conjugada) que es incolora y contiene apohemoglobina glicosilada. Los grupos hemo pueden eliminarse del producto de apohemoglobina mediante cualquier metodología comúnmente conocida en la técnica, por ejemplo, a modo de ejemplo únicamente, mediante la precipitación de la hemoglobina con acetona ácida fría seguida de la posterior diálisis del precipitado en una disolución amortiguadora. La adición de apohemoglobina parcialmente glicosilada a un calibrador, material de calibración y/o control que contenga hemoglobina genera un aumento de la hemoglobina glicosilada medida por un ensayo o ensayos de diagnóstico, ya que se reduce la señal generada por la hemoglobina total en el ensayo. En consecuencia, los umbrales superiores de hemoglobina glicosilada presentes en el (los) calibrador(es), material(es) de calibración y/o control(es) pueden cuantificarse y fijarse para la realización de los ensayos de diagnóstico relacionados con la hemoglobina.

Refiriéndose ahora a la FIGURA. 4, se muestra en la misma una realización no limitativa de un método para producir materiales de calibración de hemoglobina glicosilada y/o controles para ensayos enzimáticos que emplean fructosil péptido oxidasa. A modo de ejemplo únicamente, se utiliza fructosil-péptido sintético (en el que la secuencia, en una realización no limitativa, se deriva del extremo N-terminal de la subunidad β humana) como sustrato para la fructosil-aminoácido oxidasa. Algunos ensayos de detección basados en enzimas de hemoglobina glicosilada utilizan fructosil aminoácido oxidasa (también denominada en la presente como fructosil péptido oxidasa o FPOX). Estos ensayos de detección basados en enzimas son ventajosos y deseables porque, entre otras cosas, son rápidos y reproducibles.

LA FPOX cataliza la oxidación de los enlaces carbono-nitrógeno que unen el C1 del resto de fructosil y el nitrógeno del grupo amino de los aminoácidos que contienen fructosil. Esta reacción da lugar a un intermediario de base de Schiff inestable que se hidroliza para producir glucosona y un aminoácido y/o péptido. A continuación, el cofactor reducido de flavin adenina dinucleótido (FAD) de FPOX es reoxidado por el oxígeno molecular en disolución, lo que da lugar a la liberación de peróxido de hidrógeno.

Los métodos actuales que utilizan FPOX para medir la concentración de hemoglobina glicosilada emplean un proceso de tres pasos. En primer lugar, la hemoglobina es digerida proteolíticamente. A continuación, la enzima FPOX reacciona con un péptido fructosilado para producir glucosona, un aminoácido y peróxido de hidrógeno. El paso final implica la reacción del peróxido de hidrógeno con un sustrato para dar lugar a un producto coloreado que se mide espectrofotométricamente.

Como se ha divulgado anteriormente en la presente, FPOX puede emplearse para medir y/o detectar la concentración de hemoglobina glicosilada presente en la muestra de sangre de un paciente. En una realización no limitativa del concepto o conceptos inventivos actualmente divulgados y/o reivindicados, el fructosil-péptido sustituye parcialmente a la hemoglobina proteolizada como sustrato para la reacción FPOX antes mencionada. El uso de hemoglobina glicosilada como material para preparar un calibrador de hemoglobina glicosilada, material de calibración y/o control proporciona un péptido glicosilado N-terminal (a través de la proteólisis de la hemoglobina) a FPOX para que actúe como un sustrato para la producción de peróxido de hidrógeno. Al utilizar el sustrato sintético, la concentración aparente de hemoglobina glicosilada se eleva sin afectar al contenido total de hemoglobina, aumentando así el porcentaje de hemoglobina glicosilada medida para su uso como umbral superior dentro del (de los) calibrador(es), material(es) de calibración y/o control(es).

Con respecto al sustrato sintético, en una realización no limitativa, el sustrato sintético puede comprender y/o consistir en fructosil-valina y/o una fructosil-valina-X, en donde X es un péptido corto que comprende y/o consiste en de aproximadamente 2 aminoácidos a aproximadamente 10 aminoácidos. En una realización no limitativa, la secuencia peptídica X es análoga a la secuencia N-terminal de la cadena β de la hemoglobina humana (tal como, a modo de ejemplo únicamente, $\text{NH}_2\text{-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Lys-Ser-}$); sin embargo, una persona con conocimientos ordinarios en la técnica debería entender fácilmente que la secuencia peptídica X puede comprender y/o consistir en cualquier secuencia que permita que el fructosil-péptido actúe y funcione como un sustrato eficaz para FPOX. En consecuencia, el (los) material(es) de calibración creados mediante esta metodología comprenden y/o consisten en una combinación de hemoglobina o hemoglobinas necesarias para medir la hemoglobina total y el sustrato peptídico.

Realizaciones no limitativas del (de los) concepto(s) inventivo(s) divulgado(s) actualmente para la preparación de calibradores, materiales de calibración y/o materiales de control para calibrar niveles bajos de hemoglobina glicosilada porcentual.

Como se muestra en la FIGURA 5, en una realización no limitativa del (de los) concepto(s) inventivo(s) actualmente divulgado(s) y/o reivindicado(s), se crean calibradores, materiales de calibración y/o controles que contienen un nivel bajo

de porcentaje de hemoglobina glicosilada (incluyendo, sin limitación, un nivel de porcentaje de hemoglobina glicosilada de aproximadamente 0% de hemoglobina glicosilada) modificando químicamente la fructosa en el extremo N-terminal de las cadenas β de la hemoglobina. A modo de ejemplo, y no a modo de limitación, el nivel bajo de porcentaje de hemoglobina glicosilada comprende y/o consiste en un rango de aproximadamente 0% a aproximadamente 4%, o de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 3,5%, o de aproximadamente 1% a aproximadamente 3%, o de aproximadamente 1,5% a aproximadamente 2,5%, o menor o igual a aproximadamente 2%. Tras la modificación, la fructosa acoplada a la hemoglobina se altera químicamente y deja de ser reconocida por un anticuerpo de hemoglobina glicosilada o por FPOX o por los grupos fenilboronato. Tras la oxidación de la hemoglobina glicosilada mediante al menos un oxidante, por ejemplo, a modo de ejemplo únicamente, periodato, la reacción puede ser inactivada mediante la adición de un producto químico neutralizante, tal como, a modo de ejemplo únicamente, etilenglicol. Tras el enfriamiento de la reacción, la mezcla puede dializarse o desalarse mediante metodologías comúnmente conocidas en la técnica para eliminar los materiales de bajo peso molecular.

Refiriéndose ahora a la FIGURA. 6, se muestra en la misma una realización no limitativa de un método para producir calibrador(es), material(es) de calibración y/o controles que contengan y/o puedan detectar un nivel bajo de hemoglobina glicosilada presente en la muestra de prueba líquida de un paciente. En este método, una fase sólida (por ejemplo, a modo de ejemplo únicamente, perlas magnéticas) acopla la enzima FPOX que proteoliza las subunidades β de la hemoglobina en los hemolizados (productos resultantes de la lisis/ruptura de los eritrocitos) entre los residuos 2 y 3. A continuación, se elimina el fructosil-Val-His-NH₂ de bajo peso molecular mediante diálisis o metodologías de desalinización comúnmente conocidas en la técnica. Las perlas acopladas a FPOX se retiran posteriormente mediante, a modo de ejemplo únicamente, uno o varios imanes. A continuación, la hemoglobina truncada proteolíticamente se añade a una preparación normal de hemoglobina, incluyendo, sólo a modo de ejemplo, preparaciones normales de hemoglobina en donde el porcentaje de hemoglobina comprende y/o consiste en un rango de aproximadamente 4% a aproximadamente 6,5%, o de aproximadamente 4,5% a aproximadamente 6%, o de aproximadamente 5% a aproximadamente 5,5%, o menor o igual a aproximadamente 5,25%. En consecuencia, la concentración total de hemoglobina sigue siendo la misma, pero la concentración de hemoglobina glicosilada disminuye.

En otra realización no limitativa del (de los) concepto(s) inventivo(s) actualmente divulgado(s) y/o reivindicado(s), los calibradores, los materiales de calibración, y/o los controles pueden formularse con al menos un tinte o combinación de tintes que tengan un perfil espectral deseado, tal como, a modo de ejemplo únicamente, absorbancia(s) en el rango espectral de aproximadamente 400 nanómetros a aproximadamente 700 nanómetros. Con respecto a los ensayos de porcentaje de hemoglobina glicosilada, al menos un tinte absorbe a la(s) longitud(es) de onda utilizadas para medir la hemoglobina total en el ensayo, pero no absorbe a la(s) longitud(es) de onda utilizadas para medir la hemoglobina glicosilada o el blanco de ensayo. A modo de ejemplo únicamente, los tintes cualificados incluyen cualquier tinte que cumpla los criterios anteriores, incluyendo, sin limitación, VIS423A y/o VIS433A comercialmente disponibles para su venta en QCR Solution Corp. Por ejemplo, como se muestra en la FIGURA 7, la hemoglobina total se mide a aproximadamente 405 nanómetros, una longitud de onda absorbida por al menos un tinte. Sin embargo, al menos un tinte no absorbe a aproximadamente 340 nanómetros utilizados para medir la hemoglobina glicosilada ni a aproximadamente 700 nanómetros utilizados para el ensayo en blanco. Esta metodología da como resultado una lectura alta para la hemoglobina total y una lectura normal para la hemoglobina glicosilada, con lo que se obtiene un valor bajo de hemoglobina glicosilada porcentual (es decir, un valor de hemoglobina glicosilada porcentual inferior a aproximadamente el 4%).

En otra realización no limitativa del concepto o conceptos inventivos divulgados y/o reivindicados en la actualidad, el calibrador o calibradores, el material o materiales de calibración, y/o el control o controles para detectar y/o calibrar umbrales de bajo porcentaje de hemoglobina glicosilada pueden prepararse mezclando sangre animal (tal como, a modo de ejemplo únicamente, sangre ovina, bovina, caprina, equina, porcina y combinaciones de las mismas) con sangre humana. Cuando se emplea un inmunoensayo, la sangre animal seleccionada no debe tener una secuencia de aminoácidos N-terminal que produzca reacciones cruzadas con el anticuerpo anti-hemoglobina glicosilada utilizado en el inmunoensayo que se une al extremo N-terminal de la(s) subunidad(es) β de la hemoglobina glicosilada. Una lista no limitativa de secuencias de aminoácidos ejemplares utilizadas de acuerdo con el (los) concepto(s) inventivo(s) actualmente divulgado(s) y/o reivindicado(s) se detalla en la FIGURA 8. Esta metodología da como resultado un ensayo de hemoglobina total casi normal (es decir, de aproximadamente 4% a aproximadamente 5,6% de hemoglobina glicosilada) y un resultado de hemoglobina glicosilada bajo (es decir, menos de aproximadamente 4% de hemoglobina glicosilada), lo que conduce a un valor de hemoglobina glicosilada porcentual bajo.

En otra realización no limitativa del (de los) concepto(s) inventivo(s) actualmente divulgado(s) y/o reivindicado(s), los calibradores, materiales de calibración y/o controles para detectar y/o calibrar umbrales de hemoglobina glicosilada de bajo porcentaje pueden prepararse agotando una parte o la totalidad de la hemoglobina glicosilada de la hemoglobina total de una muestra de sangre mediante una técnica, tal como, a modo de ejemplo únicamente, la cromatografía de intercambio catiónico y/o la cromatografía de afinidad con boronato. El producto resultante contiene una cantidad normal de hemoglobina total con una concentración reducida de hemoglobina glicosilada, lo que da lugar a un valor bajo de porcentaje de hemoglobina glicosilada, como se describe en la presente.

Los calibradores, materiales de calibración y/o controles creados de acuerdo con el (los) concepto(s) inventivo(s) actualmente divulgado(s) y/o reivindicado(s) proporcionan ventajas distintivas, entre las que se incluyen: (i) se pueden preparar calibradores con un porcentaje de hemoglobina glicosilada muy bajo o muy alto; (ii) las metodologías divulgadas

5 y/o reivindicadas en la actualidad (incluyendo, sin limitación, la preparación de los calibradores, materiales de calibración y/o controles y los métodos de calibración del ensayo) permiten que el porcentaje de los niveles de hemoglobina glicosilada en dichos calibradores, materiales de calibración y/o controles sea igual al valor más bajo y/o al valor más alto del porcentaje de hemoglobina encontrado en la sangre humana; (iii) las metodologías actualmente divulgadas y/o reivindicadas no requieren cambios en los formatos de ensayo existentes; y (iv) no es necesario buscar muestras de sangre con un contenido muy bajo o muy alto de hemoglobina glicosilada porcentual (que pueden ser difíciles de encontrar y obtener).

10 Por lo tanto, de acuerdo con el (los) concepto(s) inventivo(s) actualmente divulgado(s) y reivindicado(s), se han proporcionado métodos para preparar calibradores y métodos para calibrar al menos un ensayo de diagnóstico. Tal como se describe en la presente, el (los) concepto(s) inventivo(s) actualmente divulgado(s) y/o reivindicado(s) se refiere(n) a realizaciones de métodos mejorados para producir calibradores de ensayos de diagnóstico, materiales de calibración y/o controles que abarcan la gama de ensayos clínicos del porcentaje de hemoglobina glicosilada desde muy bajo (es decir, inferior o igual a aproximadamente el 3%) hasta muy alto (superior o igual a aproximadamente el 18%), así como kits, dispositivos y métodos de uso relacionados con los mismos. En consecuencia, el presente concepto o conceptos
15 inventivos divulgados y/o reivindicados satisfacen plenamente los objetivos y ventajas expuestos anteriormente. Aunque el (los) concepto(s) inventivo(s) actualmente divulgado(s) y reivindicado(s) ha(n) sido descrito(s) en conjunto con los dibujos específicos, la experimentación, los resultados y el lenguaje expuesto anteriormente, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán aparentes para los expertos en la técnica. En consecuencia, se pretende
20 abarcar todas aquellas alternativas, modificaciones y variaciones que entren dentro del alcance del (de los) concepto(s) inventivo(s) actualmente divulgado(s) y reivindicado(s).

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un sistema de calibración que comprenda al menos dos calibradores para su uso en un instrumento de ensayo de detección de analitos, en donde el método comprende los siguientes pasos:
 - 5 preparar un primer calibrador, en donde el primer calibrador tiene una primera concentración de un analito de interés presente en la muestra de prueba líquida de un paciente, en donde la primera concentración es superior a una concentración umbral promedio del analito de interés presente en la muestra de prueba líquida del paciente; y preparar un segundo calibrador, en donde el segundo calibrador tiene una segunda concentración del analito de interés presente en la muestra de prueba líquida del paciente, en donde la segunda concentración es inferior a la concentración umbral promedio del analito de interés presente en la muestra de prueba líquida del paciente, en donde la muestra de prueba líquida del paciente es sangre entera, el analito de interés se selecciona del grupo que consiste en hemoglobina total, hemoglobina glicosilada y combinaciones de las mismas, la concentración umbral promedio de la hemoglobina glicosilada es del 4% al 8% de una concentración de la hemoglobina total presente en la muestra de prueba líquida del paciente, la primera concentración de la hemoglobina glicosilada es igual o superior al 8,1%, y la segunda concentración de la hemoglobina glicosilada es igual o inferior al 3,9%,
 - 15 en donde la segunda concentración del segundo calibrador se reduce por debajo de la concentración umbral promedio de la hemoglobina glicosilada mediante un método seleccionado del grupo que consiste en la modificación química, la utilización de al menos una enzima unida a fase sólida, la utilización de al menos un tinte y combinaciones de los mismos, en donde al menos uno de:
 - 20 la modificación química comprende la oxidación de la hemoglobina glicosilada con periodato; o bien al menos una enzima unida en fase sólida comprende fructosil péptido oxidasa unida a partículas magnéticas, o al menos un tinte absorbe a una(s) longitud(es) de onda utilizadas para medir la hemoglobina total en el ensayo, pero no absorbe a una(s) longitud(es) de onda utilizadas para medir la hemoglobina glicosilada o el blanco de ensayo.
 - 25 2. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde la primera concentración del primer calibrador se incrementa por encima de la concentración umbral promedio de la hemoglobina glicosilada mediante un método seleccionado del grupo que consiste en añadir glucosa a la muestra de sangre entera, en donde la glucosa reacciona con la hemoglobina glicosilada para formar una base de Schiff seguida de la reducción de la base de Schiff con un agente reductor, la eliminación de hemo de la apohemoglobina de la muestra de sangre entera, la alteración de la hemoglobina glicosilada mediante un sustrato sintético de fructosil-péptido, y combinaciones de los mismos.
 - 30 3. El método de conformidad con la reivindicación 2, en donde el péptido sintético es un péptido de fructosil N-terminal.
 4. Un método para calibrar al menos un ensayo de diagnóstico, en donde el método comprende los pasos de: realizar al menos dos mediciones de calibración con un sistema de calibración presente dentro de un instrumento de ensayo de diagnóstico para la realización de al menos un ensayo de diagnóstico, en donde el sistema de calibración comprende:
 - 35 un primer calibrador, en donde el primer calibrador tiene una primera concentración de un analito de interés presente en la muestra líquida de prueba de un paciente, en donde la primera concentración es superior a una concentración umbral promedio del analito de interés presente en la muestra líquida de prueba del paciente; y
 - 40 un segundo calibrador, en donde el segundo calibrador tiene una segunda concentración del analito de interés presente en la muestra de prueba líquida del paciente, en donde la segunda concentración es inferior a la concentración umbral promedio del analito de interés presente en la muestra de prueba líquida del paciente;
 - 45 en donde la muestra de prueba líquida del paciente es sangre entera, el analito de interés se selecciona del grupo que consiste en hemoglobina total, hemoglobina glicosilada y combinaciones de las mismas, la concentración umbral promedio de la hemoglobina glicosilada es del 4% al 8% de una concentración de la hemoglobina total presente en la muestra de prueba líquida del paciente, la primera concentración de la hemoglobina glicosilada es igual o superior al 8,1%, la segunda concentración de la hemoglobina glicosilada es igual o inferior al 3,9%,
 - 50 reducir la segunda concentración del segundo calibrador por debajo de la concentración umbral promedio de la hemoglobina glicosilada mediante un método seleccionado del grupo que consiste en la modificación química, la utilización de al menos una enzima unida a fase sólida, la utilización de al menos un tinte y combinaciones de los mismos, en donde al menos uno de:
 - 55 la modificación química comprende la oxidación de la hemoglobina glicosilada con periodato; o bien al menos una enzima unida en fase sólida comprende fructosil péptido oxidasa unida a partículas magnéticas; o al menos un tinte absorbe a una(s) longitud(es) de onda utilizadas para medir la hemoglobina total en el ensayo, pero no absorbe a una(s) longitud(es) de onda utilizadas para medir la hemoglobina glicosilada o el blanco de ensayo;
 - calcular una curva de calibración utilizando los valores obtenidos de al menos dos mediciones; y
 - establecer valores numéricos para la primera concentración y la segunda concentración para determinar la precisión de los resultados obtenidos a partir de la realización de al menos un ensayo de diagnóstico.

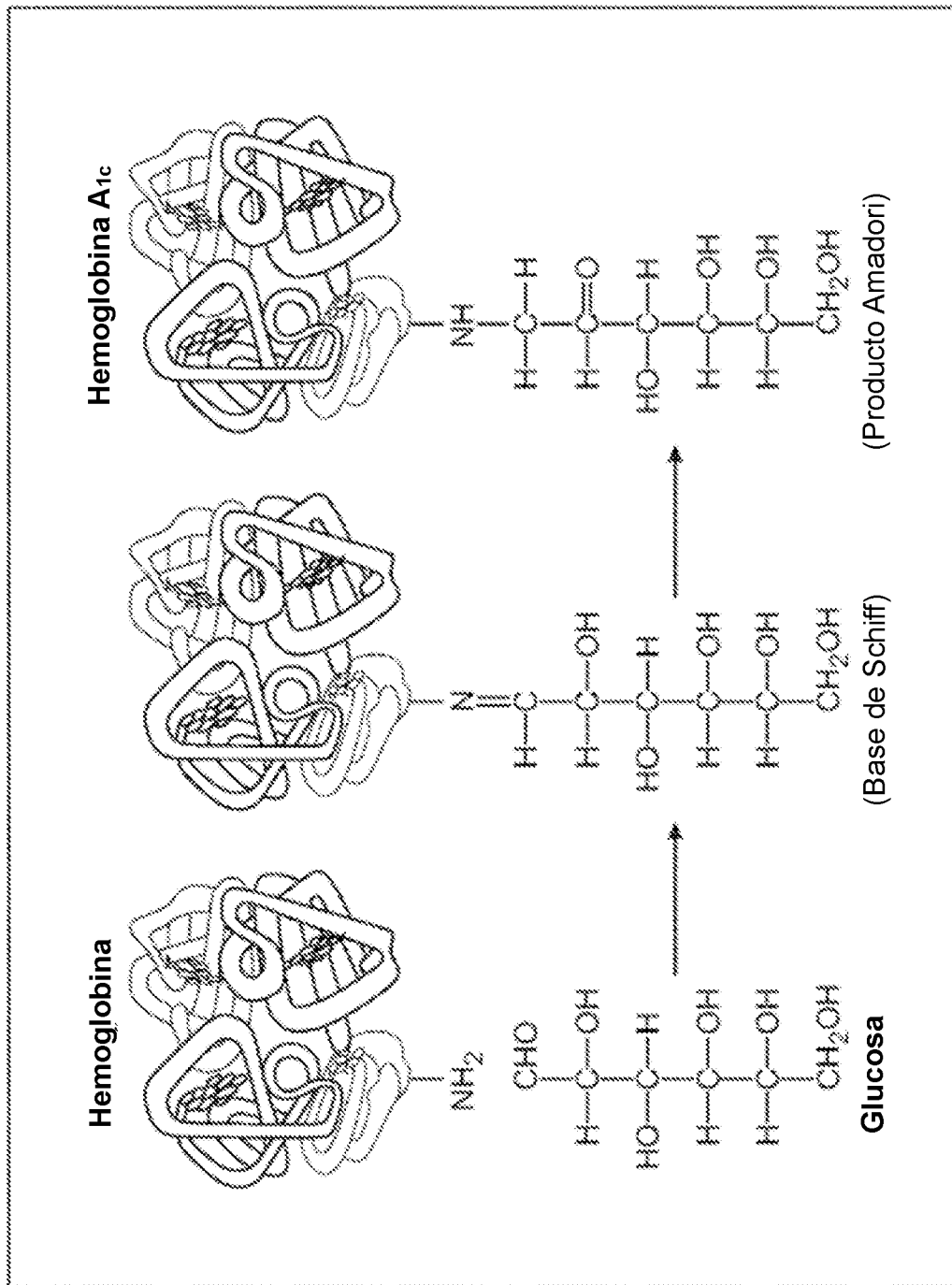


FIG. 1

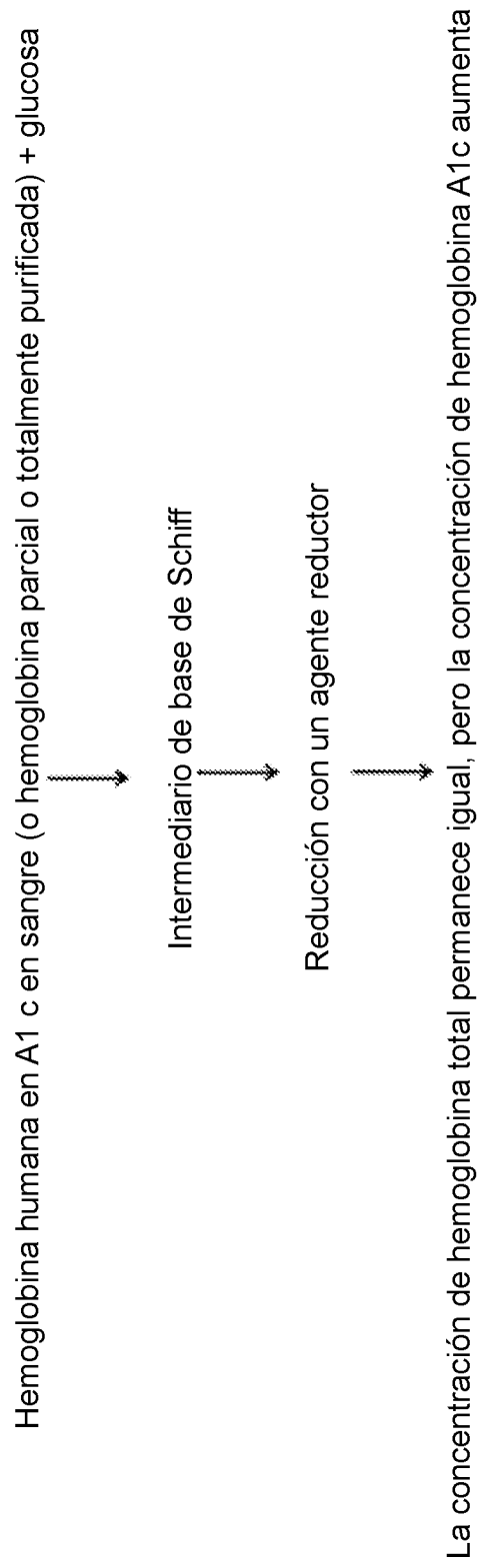


FIG. 2

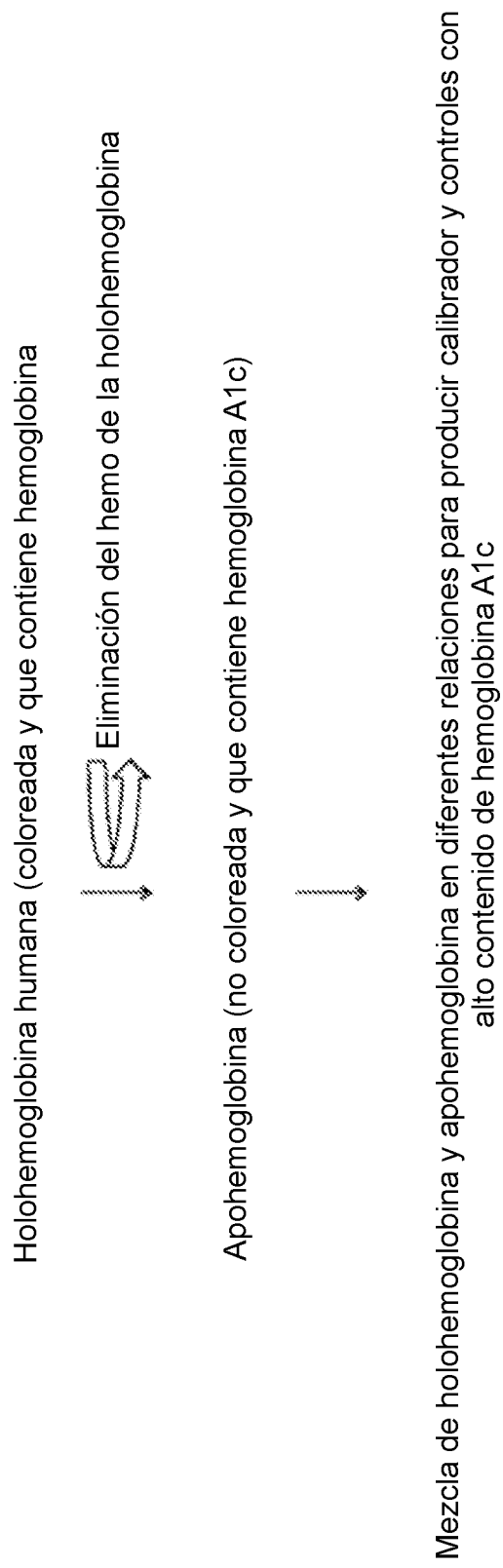


FIG. 3

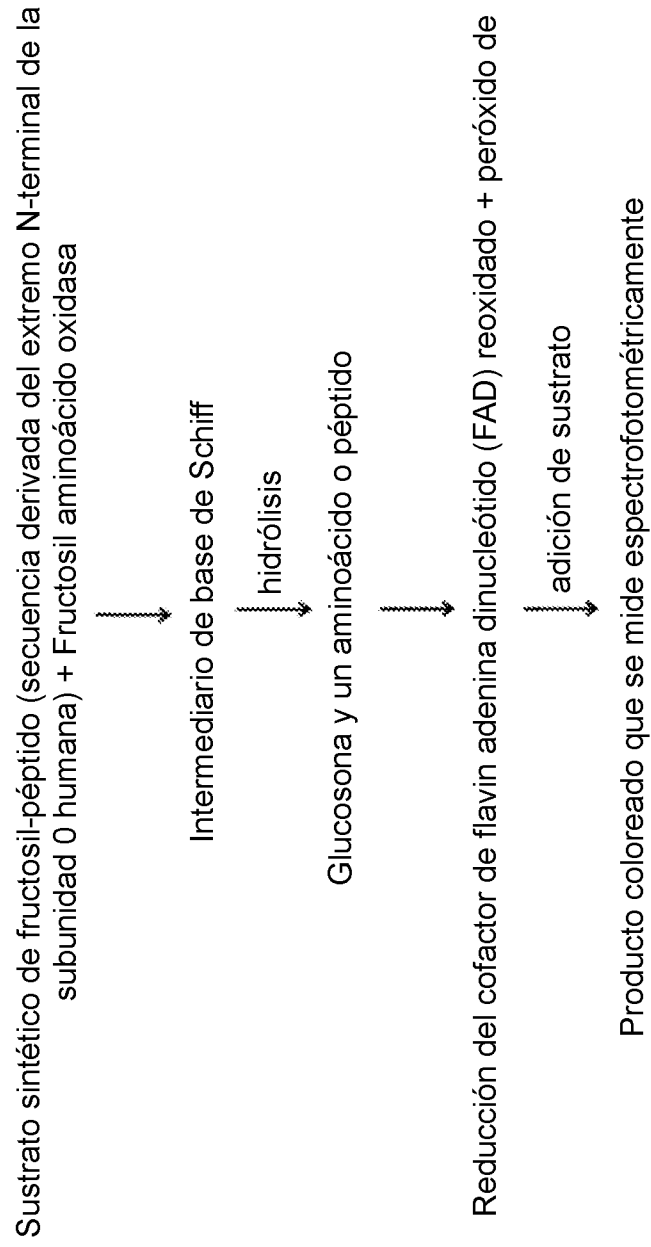


FIG. 4

D-glucosa-hemoglobina + periodato $\longrightarrow$ ácido fórmico + formaldehído + hemoglobina

FIG. 5

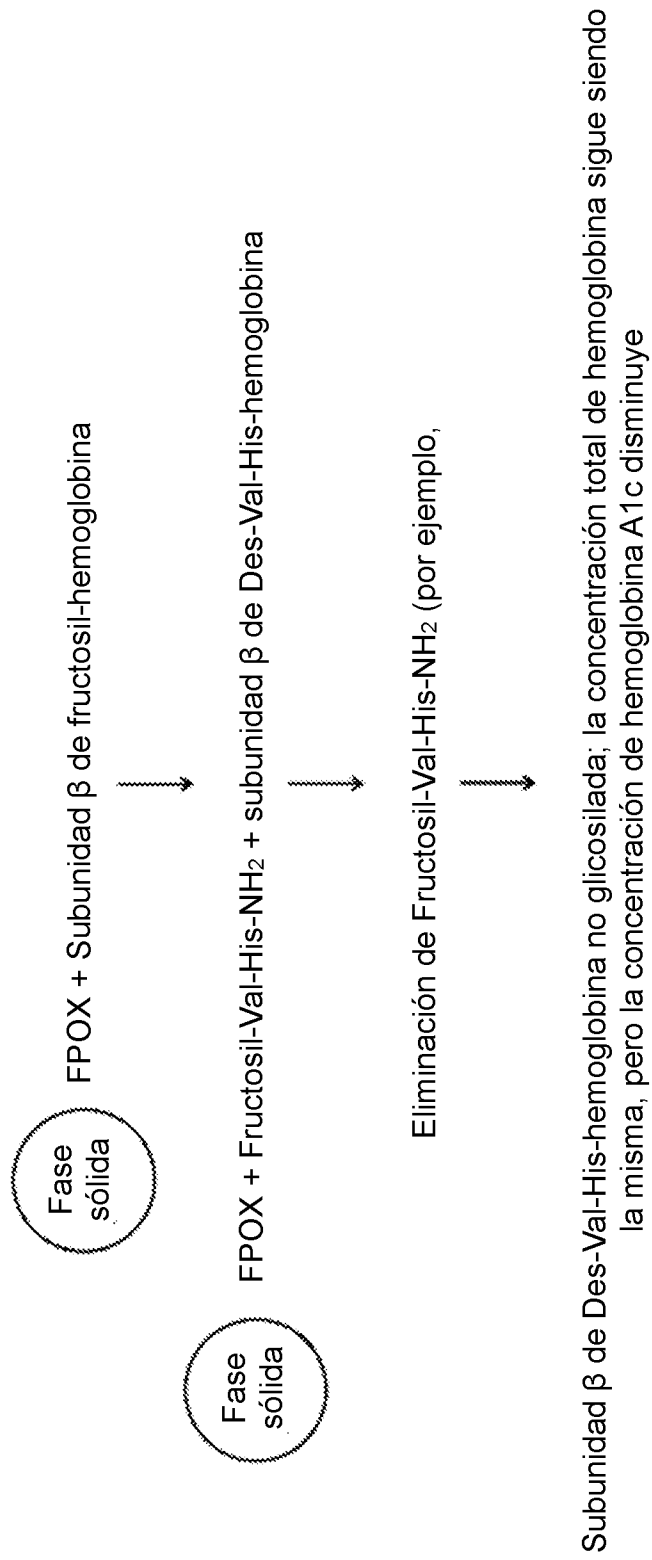
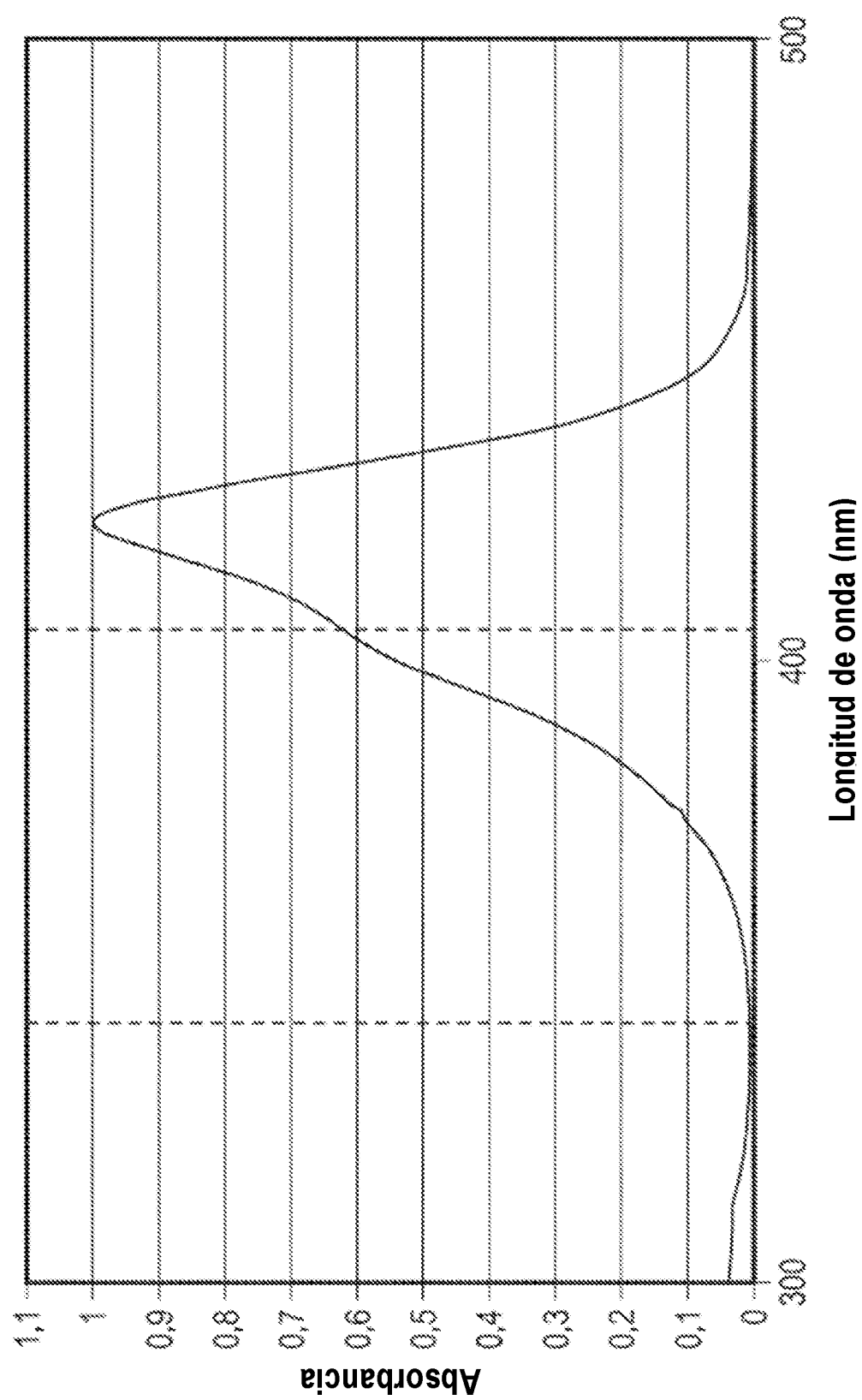


FIG. 6

**FIG. 7**

Humano: NH_2 -Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-
Ovino, bovino, caprino: NH_2 -Leu-Thr-Ala-Glu-Glu-Lys
Equino: NH_2 -Val-Gln-Leu-Ser-Gly-Glu-
Porcino: NH_2 -Val-His-Leu-Ser-Ala-Glu-

FIG. 8