



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G01N 33/00 (2019.02); G01N 33/72 (2019.02)

(21)(22) Заявка: 2016147532, 31.03.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
31.03.2015Дата регистрации:  
02.04.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
06.05.2014 DE 10 2014 106 301.5(43) Дата публикации заявки: 06.06.2018 Бюл. №  
16

(45) Опубликовано: 02.04.2019 Бюл. № 10

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 06.12.2016(86) Заявка РСТ:  
EP 2015/057024 (31.03.2015)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2015/169511 (12.11.2015)Адрес для переписки:  
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО  
"Юридическая фирма Городиский и  
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ГОРКА Гюнтер (DE),  
ВАТАДЗУ Йосифуми (JP),  
МЕТЦМАНН Эрвин (DE),  
ЛЯЙН Александра (DE),  
МЮЛЛЕР Хольгер (DE),  
ГРИММЛЕР Маттиас (DE)

(73) Патентообладатель(и):

ДАЙАСИС ДАЙАГНОСТИК СИСТЕМЗ  
ГМБХ (DE)(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: US 2013115646 A1, 09.05.2013. EP  
2161333 A1, 10.03.2010. Н.П.Балабан.  
Металлопротеазы бацилл. Классификация,  
структурные особенности и  
термостабильность белков / Естественные  
науки, 2007, т. 149, кн.2, стр. 7-23 [Найдено  
в Интернете он-лайн 06.11.2018 (см. прод.)

(54) ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ HbA1C

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу определения количества гликозилированного гемоглобина (HbA1c) в пробе, включающему гемолиз эритроцитов в пробе для высвобождения содержащегося в них HbA1c, приведение в контакт высвобожденного гемоглобина с протеолитическим агентом для получения

гликозилированных продуктов разложения гемоглобина, определение количества HbA1c за счет количественного определения гликозилированных продуктов разложения гемоглобина. 2 н. и 13 з.п. ф-лы, 6 пр., 8 табл., 5 ил.

(56) (продолжение):

file:///C:/Documents%20and%20Settings/otd1442/%D0%9C%D0%BE%D0%B8%20%D0%B4%D0%BE%D0%BA%D

RU 2 6 8 3 7 7 3 C 2

RU 2 6 8 3 7 7 3 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*G01N 33/00 (2019.02); G01N 33/72 (2019.02)*(21)(22) Application: **2016147532, 31.03.2015**(24) Effective date for property rights:  
**31.03.2015**Registration date:  
**02.04.2019**

Priority:

(30) Convention priority:  
**06.05.2014 DE 10 2014 106 301.5**(43) Application published: **06.06.2018** Bull. № 16(45) Date of publication: **02.04.2019** Bull. № 10(85) Commencement of national phase: **06.12.2016**(86) PCT application:  
**EP 2015/057024 (31.03.2015)**(87) PCT publication:  
**WO 2015/169511 (12.11.2015)**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO  
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**GORKA, Gunther (DE),  
WATAZU, Yoshifumi (JP),  
METZMANN, Erwin (DE),  
LEIN, Alexandra (DE),  
MULLER, Holger (DE),  
GRIMMLER, Matthias (DE)**

(73) Proprietor(s):

**DIASYS DIAGNOSTIC SYSTEMS GMBH  
(DE)**(54) **ENZYMATIC DETERMINATION OF HbA1c**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to a method for determining the amount of glycated haemoglobin (HbA1c) in a sample comprising hemolysis of erythrocytes in the sample to release HbA1c contained therein, contacting the released haemoglobin with a proteolytic agent to produce glycated haemoglobin decomposition products, determining the amount of

HbA1c by quantifying the glycated haemoglobin decomposition products.

EFFECT: providing a method of determining the amount of glycated haemoglobin (HbA1c) in a sample and reagents which can be used in that respect, in which the chemical compounds essential to the reaction are present in sufficiently stable form.

15 cl, 6 ex, 8 tbl, 5 dwg

**RU 2 683 773 C2**

**RU 2 683 773 C2**

**Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к способу определения в пробе количества гликозилированного гемоглобина (HbA1c), а также к набору реагентов, который может быть использован в способе определения в пробе количества гликозилированного гемоглобина (HbA1c).

**Предшествующий уровень техники**

Гликозилированный гемоглобин (HbA1c) по определению IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (Международная федерация клинической химии и лабораторной медицины) представляет собой стабильный продукт присоединения глюкозы к N-концевому валину бета-цепи гемоглобина, а количество HbA1c в расчете на общее количество гемоглобина (ммоль HbA1c на моль общего гемоглобина) является репрезентативным для среднего содержания глюкозы в крови за последние восемь недель перед отбором проб крови и поэтому обозначается также как "долговременное содержание сахара в крови". Поэтому показатель HbA1c, значение которого, как правило, должно находиться в интервале от 20 до 42 ммоль/моль, представляет собой важный индикатор для диагностирования и лечения сахарного диабета.

Известные способы определения HbA1c представляют собой, например, иммунологические тесты, например турбидиметрические иммунологические тесты (TIA), и высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). С некоторых пор используют также ферментативный способ, в случае которого превращение гликозилированного гемоглобина контролируют количественно с фруктозиламиноацилоксидоредуктазой (FAOD).

В случае ферментативного исследования - впрочем, так же, как и в случае любых других способов анализа HbA1c - первая стадия состоит в том, что эритроциты в пробе крови делают гемолитически доступными для того, чтобы высвободить содержащийся в них HbA1c. Затем высвобожденный гликозилированный гемоглобин приводят в контакт с протеолитическим агентом для получения гликозилированных продуктов разложения гемоглобина. К этим протеолитически получаемым продуктам разложения относятся фруктозилвалин (Fru-Val) и фруктозилвалин-гистидин (Fru-Val-His), отщепляемые от бета-цепи гликозилированного гемоглобина со стороны концевых аминокислотных групп, или даже фруктозилпептиды с более длинными цепями. Фруктозиламинокислота или фруктозилпептид окисляются благодаря активности фермента фруктозиламиноацилоксидазы (FAOX) или фермента фруктозилпептидоксидазы (FPOX), причем в результате этой стадии окисления образуется пероксид водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Количество пероксида водорода, образующегося на указанной стадии окисления, коррелирует с количеством фруктозилированной аминокислоты или фруктозилированного пептида. Следовательно, количество пероксида водорода, получаемого на этой стадии, представляет собой меру количества HbA1c в пробе. Поэтому, в конечном счете, определение количества HbA1c может быть осуществлено благодаря тому, что количество пероксида водорода определяют, например, соответственно фотометрически оцениваемой цветной реакции, которая стехиометрически коррелирует с количеством пероксида водорода. Однако принципиально могут соответственно применяться также и любые другие способы анализа для количественного определения в пробе пероксида водорода.

В случае некоторых способов количественного определения пероксида водорода пероксидом водорода окисляют восстановленное лейкосоединение. Однако этот способ

обуславливает трудность, состоящую в том, что вследствие автоокисления красителя в лейкоформе появляется неспецифический холостой сигнал и повышается спектральный фон, что затрудняет точное фотометрическое измерение сигнала анализируемого вещества. С другой стороны, красители в лейкоформе по сравнению с другими окрашенными веществами обладают преимуществом, состоящим в том, что они обычно имеют более высокие молекулярные коэффициенты поглощения. Кроме того, красители в лейкоформе большей частью обладают настолько высоким максимумом поглощения, что оптическим влиянием, обуславливаемым взаимодействием с компонентами крови, такими как, например, билирубин и гемоглобин, в большинстве случаев можно пренебречь.

#### **Задача изобретения**

Долговременная стабильность химических и диагностических реагентов представляет собой трудно разрешимую проблему, в частности, тогда, когда реагенты подвергаются действию особенно высоких или особенно низких температур и/или значительному перепаду температур во время транспортировки, хранения и/или обработки. Это положение в равной мере имеет силу, разумеется, как в отношении указанных ранее красителей в лейкоформе, так и в отношении ферментов, применяемых для определения HbA1c, и других реагентов.

Однако обеспечение стабильности исследуемого исходного материала, а также промежуточных и конечных продуктов реакции также имеет немаловажное значение для получения надежно воспроизводимых результатов.

Поэтому перед авторами настоящего изобретения стояла задача разработать способ определения в пробе количества гликозилированного гемоглобина (HbA1c) и применяемые при этом реагенты, в случае которого или которых существенные для реакции химические соединения находятся в достаточно стабильной форме. Кроме того, в случае способа или реагентов по настоящему изобретению одновременно с определением количества HbA1c предпочтительно должна также иметься возможность определения общего гемоглобина.

#### **Описание изобретения**

Описанная выше задача согласно настоящему изобретению решается в разных, подробно описанных далее вариантах, общим для которых является то, что они относятся к способу определения в пробе количества HbA1c, в случае которого осуществляют следующие стадии:

а) гемолиз эритроцитов в пробе для высвобождения содержащегося в них гемоглобина, включая HbA1c;

б) приведение в контакт гемоглобина (высвобожденного на стадии а), включая HbA1c, с протеолитически действующим агентом для получения гликозилированных продуктов разложения гемоглобина и

с) определение количества HbA1c за счет количественного определения гликозилированных продуктов разложения гемоглобина (полученных на стадии б).

Под пробой в связи с настоящим изобретением понимают материал, подготовленный для целей анализа и содержащий подлежащую анализу долю гемоглобина и/или HbA1c. В большинстве случаев под пробой понимают пробу свежей цельной крови. Однако настоящее изобретение охватывает также такие пробы, как, например, консервированная кровь, очищенная кровь, лиофилизат цельной крови, концентрат эритроцитов, предварительно гемолизированные пробы крови, стандартные растворы гемоглобина, стандартные растворы HbA1c и стандартные растворы, содержащие синтетические продукты разложения гемоглобина, такие как, например, синтетические продукты

разложения HbA1c.

Если HbA1c уже находится в анализируемой пробе в свободном виде, то стадия а) не требуется. В случае стандартных растворов, которые содержат синтетические продукты разложения гемоглобина или HbA1c, стадия б) также не требуется. Если гемоглобин или соответствующий ему HbA1c или его продукты разложения не содержатся в анализируемой пробе в растворенном виде, то их до или во время стадии а) вносят, как правило, в водный раствор.

Гемолиз эритроцитов принципиально может быть осуществлен любыми механическими, химическими или осмотическими гемолизирующими средствами или способами, о которых специалистам в данной области техники известно, что они ведут к полному гемолизу эритроцитов. Средства или способы в смысле настоящего изобретения являются приемлемыми в качестве гемолитически действующих тогда, когда они ведут к растворению эритроцитов вследствие разрушения клеточной мембраны и к переходу в окружающую среду гемоглобина, содержащегося в эритроцитах.

Примерами гемолитически действующих средств или способов, известных специалистам в данной области техники, являются ультразвуковая обработка или прибавление гемолитических поверхностно-активных веществ или сильных гипотонических солевых растворов.

В вариантах осуществления настоящего изобретения, в случае которых применяют гемолитически действующие поверхностно-активные вещества, они могут быть выбраны, например, из ионоактивных, анионоактивных и амфолитных поверхностно-активных веществ, причем под термином "поверхностно-активное вещество" в данном случае понимают вещества, в число которых входят вещества, которые уменьшают поверхностное натяжение жидкости или поверхностное натяжение на границе раздела между двумя фазами.

В некоторых вариантах осуществления применяемые гемолитически действующие поверхностно-активные вещества выбирают, например, из следующих веществ: гемолитически действующие полиэтиленгликоли (PEG), гемолитически действующие гликозиды и сложные эфиры, гемолитически действующие полиоксиэтиленалкиловые эфиры, гемолитически действующие полиоксиэтиленалкилфениловые эфиры, гемолитически действующие полиоксиэтиленгликоли, гемолитически действующие полиоксипропиленполиоксиэтиленовые трехблочные полимеры (полоксамер, плуроникс), н-додецил- $\beta$ -D-мальтозид, н-гептил- $\beta$ -D-тиогликозид, н-октил- $\beta$ -D-тиогликозид, сахарозолаурат, сахарозокапрат, сахарозолинолат, сахарозопальмитат, сахарозохолат и производные указанных соединений или их смеси.

В качестве протеолитически действующего агента принципиально приемлемыми являются любые известные специалистам в данной области техники протеолитически действующие средства, такие как, например, протеазы, причем средство в смысле настоящего изобретения протеолитически действует тогда, когда оно ведет к расщеплению белков вследствие гидролиза пептидных связей.

В вариантах осуществления, в случае которых протеолитический агент представляет собой протеазу, он принципиально может быть выбран из любых протеаз, полученных рекомбинантным путем из эукариотов или прокариотов или эндогенным путем из организмов или компонентов организмов, типа сериновой, треониновой, цистеиновой, аспарагиновой протеазы, металлопротеазы или неизвестного типа, таких как, например, акрозин, аминопептидаза В, бромелаин, кальпаин I, карбоксипептидаза А, катепсин А, катепсин В, катепсин D, катепсин Е, катепсин К, химотрипсин, коллагеназа,

дипептидилпептидаза 4, диспаза, эластаза, фактор Па, фактор Ха, фицин, GPR-эндопептидаза, ВИЧ-протеаза, калликреин, MBTPS1, бромелаин, папаин, пепсин, плазмин, препиллинпептидаза типа IV, пролилолигопептидаза, протеиназа К, протеасома, ренин, секретазы (альфа-, бета- и гамма-секретаза), термолизин (ЕС 3.4.24.27), тромбин, трипсин, урокиназа, протеаза N из *Bacillus sp.*, протеаза P из *Aspergillus sp.*, протеаза XIV из *Streptomyces sp.* и протеаза S из *Bacillus stearothermophilus*.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения преимущественно можно использовать протеазы, которые специфически расщепляют HbA1c. Однако в общем случае по настоящему изобретению не требуется специфичность протеазы применительно к различию между гликозилированным и негликозилированным гемоглобином. Таким образом, в этом отношении могут быть использованы также протеазы, которые специфически не реагируют на различия между HbA1c и негликозилированным гемоглобином. Во многих вариантах осуществления может быть даже в явно выраженной форме желательным применение протеазы, которая не проявляет специфического действия.

В случае многих вариантов настоящего изобретения не требуется, чтобы используемая протеаза приводила к определенным продуктам разложения. Однако во многих вариантах осуществления настоящего изобретения целенаправленно используют протеазу, протеолитическая активность которой ведет к высвобождению фруктозилвалин-гистидина или фруктозилвалина из бета-цепи гликозилированного гемоглобина со стороны концевых аминокрупп.

Определение количества HbA1c может быть принципиально осуществлено любыми известными специалистам в данной области техники способами количественного определения получаемых на стадии b) гликозилированных продуктов разложения гемоглобина, такими как, например, анализ ВЭЖХ или ферментативное определение соответственно описанному ранее.

Наряду с вышеописанным способом в настоящем изобретении предложены также наборы реагентов для применения в способе определения в пробе количества HbA1c, отличающиеся тем, что они содержат по меньшей мере два разных раствора в отдельных сосудах, причем по меньшей мере два разных раствора составлены соответственно так, чтобы осуществлять разные варианты настоящего изобретения, описанные далее подробно.

#### Аспект 1. Стабилизация протеазы

Описанная выше задача настоящего изобретения соответственно первому варианту решена благодаря тому, что предложен способ определения в пробе количества HbA1c, соответственно которому - в случае необходимости - осуществляют стадии от а) до с).

Протеолитически действующий агент, применяемый на стадии b), согласно предложенному варианту настоящего изобретения активируется благодаря тому, что по меньшей мере два разных раствора приводят в контакт с HbA1c, причем один из растворов имеет значение pH в интервале от 1 до 8 и содержит:

- i) по меньшей мере одну протеазу;
- ii) соответственно от 0,1 до 2 ммоль/л агента, хелатирующего двухвалентные ионы металлов, на 1000 ед/мл протеазы и
- iii) от 0,5 до 10 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  или от 0,5 до 10 ммоль/л  $\text{Mg}^{2+}$ , причем молярное соотношение "хелатирующий агент:  $\text{Ca}^{2+}$ " или "хелатирующий агент:  $\text{Mg}^{2+}$ " находится в интервале от 1:2 до 1:20, а другой раствор содержит от 100 до 5000 мкмоль/л двухвалентного иона металла, выбранного из  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ .

Кроме того, предложен набор реагентов для применения в способе определения в пробе количества HbA1c, отличающийся тем, что набор реагентов содержит по меньшей мере два разных раствора в отдельных сосудах, причем один из растворов имеет значение pH в интервале от 1 до 8 и содержит указанные ранее компоненты от i) до iii),  
 5 причем молярное соотношение "хелатирующий агент: Ca<sup>2+</sup>" или "хелатирующий агент: Mg<sup>2+</sup>" находится в интервале от 1:2 до 1:20, а другой раствор содержит от 100 до 5000 мкмоль/л двухвалентного иона металла, выбранного из Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup>.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения значение pH раствора, содержащего протеазу, составляет не менее 4 и/или не более 6. В других вариантах осуществления настоящего изобретения значение pH раствора, содержащего протеазу, составляет больше 4 и/или меньше 6. В особом варианте осуществления настоящего изобретения значение pH раствора находится в интервале от 4,5 до 5,5, а в особенно специфических вариантах осуществления оно находится в интервале от 4,9 до 5,1.

Активность металлопротеаз зависит от присутствия двухвалентных ионов металлов, таких, как Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> или Zn<sup>2+</sup>. В настоящее время различают 54 семейства металлопротеаз в 15 группах, причем группа МА с 39 семействами имеет исключительное значение. Только 19 из этих 39 семейств могут быть сопоставлены с так называемыми нейтральными цинк-металлопротеазами. Остальные металлопротеазы являются марганец- или кобальт-зависимыми.

К группе МА относятся, в частности, следующие металлопротеазы: мембранная аланиламинопептидаза, пептидилдипептидаза А, тиометилолигопептидаза, олигопептидаза F (*Lactococcus*), миколизин, иммуноингибитор А (*Bacillus*), малая нейтральная стрептомицетовая протеаза, лейшманолизин, бактериальная коллагеназа, коллагеназа colA, матрикс-металлопептидаза 1, серрализин, фрагилизин, аутолизин (*Chlamydomonas*), астацин, репролизин, неприлизин, IgA-специфическая металлоэндопептидаза, тентоксилизин, термолизин, нейтральная стафилококковая протеаза, карбоксипептидаза, такая как летальный фактор сибирской язвы, дейтеролизин, фунгализин, белок деления клетки ftsH, цитофаголизин, паппализин 1, эндопептидаза Ste24 (*Saccharomyces*), эндопептидаза HtpX (*E. coli*), архелизин, пептидаза blaR1, пептидаза prtB, энханцин, глициламинопептидаза (*Sphingomonas capsulata*), пептидаза IgA (*Clostridium ramosum*), пептидаза stcE (*E. coli*), пептидил-Asp-металлоэндопептидаза (*P. aeruginosa*) и пептидаза ImmA.

Если протеазы в течение длительного промежутка времени находятся в своей активной форме, то существует опасность, что значительная часть фермента разрушится вследствие аутопротеолиза. В свете этого часто требуется временная инактивация ферментативной активности протеаз, когда требуется избежать, чтобы фермент подвергнулся аутопротеолизу.

Проблема аутопротеолиза протеаз по существу уже известна на предшествующем уровне техники. Для решения этой проблемы на предшествующем уровне техники, например, в случае термолизиновой протеазы предложено удалять из термолизина цинк хелатирующими агентами, в частности реагентами, содержащими SH-группы, или простым избытком ЭДТА.

Однако авторами настоящего изобретения обнаружено, что избыток хелатирующего агента может оказывать отрицательное влияние на стабильность протеазы, так как хелатирующий агент не только удаляет из протеазы - как то требуется - кофакторы, являющиеся существенными для каталитической активности, но также и значительную долю Ca<sup>2+</sup> и/или Mg<sup>2+</sup>, хотя стабильность и структурная целостность многих протеаз

в присутствии  $Mg^{2+}$  или  $Ca^{2+}$  сохраняется более длительно. Кроме того, авторами настоящего изобретения установлено, что размещение протеазы в ее инактивированной форме в отделении для реагентов при специфическом значении pH и реактивация

5 протеазы посредством двухвалентного иона металла, который выбран из  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  и  $Zn^{2+}$  и источник которого помещен во второе отделение для реагентов, представляет собой наилучшую форму долговременного хранения протеазы без значительной потери активности.

Так как ионы кальция или магния имеют существенное значение для стабильности

10 белковой структуры протеазы, следовательно, использование избытка хелатирующего агента способствует дестабилизации белка протеазы. При этом авторами настоящего изобретения было обнаружено, что этой дестабилизации можно противостоять за счет того, что задают значительный избыток  $Ca^{2+}$  и/или  $Mg^{2+}$ , который способствует тому, что применение хелатирующего агента в количестве, необходимом для дезактивации

15 протеазы, не сопровождается дестабилизацией белковой структуры протеазы.

В этой связи решающее значение в первую очередь имеет молярное соотношение применяемых ионов кальция или магния в расчете на применяемое количество хелатирующего агента, так как благодаря этому обеспечивается то, что ионы кальция или магния находятся в достаточном количестве для того, чтобы стабилизировать

20 белковую структуру протеазы при этом без вытеснения двухвалентных ионов металлов, выбранных из  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ , из хелатного комплекса хелатирующим агентом.

Примеры приемлемых в смысле настоящего изобретения агентов, хелатирующих двухвалентные ионы металлов, представляют собой ацетилацетон, нитрилотриуксусная

25 кислота (НТА), этилендиамин, этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), N-(2-гидроксиэтил) этилендиамин-N,N,N'-триуксусная кислота тринатриевая соль (НEDТА), циклогександиаминтетрауксусная кислота (CDТА), этиленгликоль-бис-(аминоэтилэфиро)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота (ЭГТА), 2-(2-аминоэтиламино)этанол, диэтилентриамин, иминодиацетат, триэтилентетрамин, триэтилентетрамингексауксусная

30 кислота (ТТНА), триаминотриэтиламин, нитрилотриацетат, бис-(салицилиден) этилендиамин, этилендиаминотриацетат, этилендиаминтетраацетат, диэтилентриаминпентаацетат (ДТРА), 1,4,7,10-тетраазоциклододекан-1,4,7,10-

тетраацетат, оксалат, тартрат, цитрат, диметилглиоксим, 8-гидроксихинолин, 2,2'-

35 бипиридин, 1,10-фенантролин, димеркаптоянтарная кислота, 1,2-бис-(дифенилфосфино) этан.

Используемый агент, хелатирующий двухвалентные ионы металлов, выбранных из  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ , связывается с двухвалентными ионами металлов, выбранными из  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ , с более сильным сродством, чем с ионами кальция или магния. Используемый хелатирующий агент предпочтительно связывается по меньшей мере в

40  $10^3$  раз с более сильной связью с двухвалентными ионами металлов, выбранными из  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ , по сравнению с ионами кальция или магния.

Концентрация хелатирующего агента в зависимости от количества протеазы может быть свободно выбрана в пределах указанных ранее интервалов. В одном из вариантов осуществления раствор содержит от 0,5 до 1,5 ммоль/л хелатирующего агента на 1000 ед/мл протеазы. В другом варианте осуществления раствор содержит от 0,9 до 1,1 ммоль/л хелатирующего агента на 1000 ед/мл протеазы.

Количество ионов кальция или магния также может быть свободно выбрана в

указанных ранее интервалах концентрации. В одном из вариантов осуществления концентрация ионов кальция или магния находится в интервале от 3 до 8 ммоль/л. В другом варианте осуществления концентрация ионов кальция или магния находится в интервале от 4 до 7 ммоль/л.

5 Ионы металлов могут содержаться в используемом растворе реагентов в любой приемлемой солевой форме, если выбранная солевая форма позволяет вносить в композицию требуемое количество находящегося в растворе иона металла, например, в виде хлоридов, нитратов, сульфатов, формиатов и ацетатов. В вариантах осуществления, в случае которых в композиции присутствует ион  $\text{Ca}^{2+}$  или  $\text{Mg}^{2+}$ , соль кальция или магния, содержащаяся в используемом растворе реагентов, в некоторых вариантах осуществления представляет собой хлорид, нитрат, формиат, ацетат кальция или соответствующую соль  $\text{Mg}^{2+}$ . В вариантах осуществления, в случае которых двухвалентный ион металла выбран из  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ , соль металла, содержащаяся в используемом растворе реагентов, может, например, представлять собой хлорид железа, нитрат марганца, формиат кобальта или ацетат цинка.

Молярное соотношение "хелатирующий агент:  $\text{Ca}^{2+}$ " или "хелатирующий агент:  $\text{Mg}^{2+}$ " может быть свободно выбрано в интервале от 1:2 до 1:20 в зависимости от варианта осуществления. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молярное соотношение "хелатирующий агент:  $\text{Ca}^{2+}$ " или "хелатирующий агент:  $\text{Mg}^{2+}$ " находится в интервале от 1:4 до 1:10. Во многих вариантах осуществления соотношение "хелатирующий агент:  $\text{Ca}^{2+}$ " или "хелатирующий агент:  $\text{Mg}^{2+}$ " находится в интервале от 1:4 до 1:8. В других вариантах осуществления соотношение находится в интервале от 1:5 до 1:7.

Реактивацию протеазы, инактивированную описанным ранее способом, по настоящему изобретению осуществляют прибавлением раствора, содержащего от 100 до 5000 мкмоль/л иона металла, который является существенным для ферментативной активности соответственно применяемой протеазы ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  или  $\text{Zn}^{2+}$ ). Авторами настоящего изобретения обнаружено, что специфическое количество соответствующего двухвалентного иона металла достаточно для того, чтобы в белковой структуре протеазы вновь занять места, необходимые для активации протеазы, несмотря на одновременно присутствующие в значительном количестве хелатирующий агент и ионы кальция или магния. Содержание ионов металлов в активирующем растворе может быть свободно выбрано в указанном интервале в зависимости от варианта осуществления. В некоторых вариантах осуществления соотношение ионов металлов находится в интервале 500-2000 мкмоль/л. В других вариантах осуществления соотношение ионов металлов находится в интервале от 200 до 400 мкмоль/л.

40 В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения раствор, содержащий один из двухвалентных ионов металлов, выбранных из  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ , представляет собой гемолизирующий раствор, который на стадии а) прибавляют к пробе, причем этот гемолизирующий раствор содержит гемолитически действующее поверхностно-активное вещество. Одна из задач настоящего изобретения состоит именно в том, чтобы совместить как можно большее число реагентов, используемых при определении  $\text{HbA}_{1c}$ , в возможно меньшем числе комбинированных растворов реагентов. В этой связи было выявлено, что двухвалентные ионы металлов, выбранные из  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  и требующиеся для более поздней активации протеазы, могут

содержаться в одном из других растворов реагентов, отличающихся от раствора, который содержит протеазу. Например, двухвалентные ионы металлов, выбранные из  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ , во многих вариантах осуществления настоящего изобретения содержатся в растворе, посредством которого вводят FPOX или FAOX (см. далее R1), или также в гемолизирующем растворе, который используют непосредственно в начале анализа HbA1c.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения разные реагенты, используемые при определении HbA1c, совмещают в виде следующих растворов, содержащихся в отдельных сосудах:

- гемолизирующий раствор (H), содержащий гемолитически действующее поверхностно-активное вещество и от 100 до 5000 мкмоль/л двухвалентного иона металла, выбранного из  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ ;

- первый раствор реагентов (R1), содержащий FPOX или FAOX и пероксидазу, и

- второй раствор реагентов (R2), дополнительно содержащий протеазу и от 0,1 до 2 ммоль/л агента, хелатирующего двухвалентные ионы металлов, на 1000 ед/мл протеазы и от 1 до 10 ммоль/л  $Ca^{2+}$  или  $Mg^{2+}$ , причем молярное соотношение "хелатирующий агент:  $Ca^{2+}$ " или "хелатирующий агент:  $Mg^{2+}$ " находится в интервале от 1:2 до 1:20, и краситель в лейкоформе.

Указанный ранее набор реагентов может быть использован в способе определения HbA1c описанным далее образом. Сначала в случае необходимости осуществляют подготовку проб, во время которой к цельной крови прибавляют гемолитический раствор. Затем к образующемуся при этом гемолизату прибавляют первый раствор реагентов (R1), что ведет к тому, что FPOX, содержащаяся в первом растворе реагентов, расщепляет возможно содержащийся эндогенный фруктозилпептид, а не терминально фруктозилированные пептиды, относящиеся к определению HbA1c, так как они еще не высвобождены.

После того как реакция по существу завершится, осуществляют фотометрическое определение содержания общего гемоглобина в предварительно инкубированном гемолизате. Затем осуществляют собственно инкубацию, во время которой к предварительно инкубированному гемолизату прибавляют второй раствор реагентов (R2). Содержащийся в нем фермент Аро-протеаза (например, фермент Аро-термолизин) активируется дополнительными двухвалентными ионами металлов (например, ионами цинка), уже содержащимися в композиции благодаря гемолизирующему раствору, и расщепляет, в частности, N-терминально гликозилированный пептид бета-цепи гемоглобина. Затем отщепленный гликозилированный пептид взаимодействует с FPOX, причем при расщеплении гликозилированного пептида в пептид и глюкозон образуется пероксид водорода.

Пероксидаза, уже внесенная в композицию с первым раствором реагентов (R1), в присутствии образовавшегося пероксида водорода способствует окислению лейкоформы красителя в его окрашенную окисленную форму. Затем может быть осуществлено собственно определение HbA1c, например, фотометрическим способом в течение очень короткого времени (например, в течение от 10 до 30 с в зависимости от исполнения измерительного прибора) после прибавления второго раствора реагентов (R2), т.е. непосредственно до прохождения реакции, опосредуемой FPOX, и еще один раз в более поздний момент (например, через отрезок времени от 2 до 15 минут, в зависимости от исполнения измерительного прибора) после прибавления R2, т.е. после завершения обусловленного пероксидом водорода окисления лейкоформы красителя. В итоге

определение содержания HbA1c осуществляют по разности между обоими измерениями через соотношение содержания HbA1c и ранее определенного общего гемоглобина. Однако интервал измерений очень сильно зависит от применяемого анализатора, фотометра и т.п. В соответствии с этим возможно также осуществлять только прямое измерение через 2-15 минут.

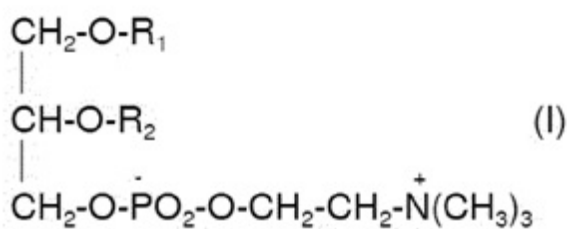
#### Аспект 2. Стабилизация коагулированного гемоглобина

Наряду со стабилизацией протеазы авторами настоящего изобретения поставлена также задача подвергнуть содержащийся в пробе гемоглобин, включая HbA1c, как можно более сильной коагуляции и иметь возможность стабилизировать в этой коагулированной форме для того, чтобы, например, обеспечить как можно более эффективную пептизацию гемоглобина протеазой и перевести гем в стабильную форму, приемлемую для фотометрического измерения.

Из предшествующего уровня техники известно, что при снижении значения pH в гемолизате до некоторого уровня гемоглобин коагулирует. В случае традиционных способов определения количества HbA1c осуществляют коагуляцию при значении pH около 5. Однако более значительное снижение значения pH имеет недостаток, состоящий в том, что обработанный таким образом гемоглобин сильно денатурируется и агглютинируется и выпадает в этой форме в осадок, так что больше не находится в форме, приемлемой для пептизации протеазой.

Однако авторами настоящего изобретения был найден путь, которым может быть достигнута крайне быстрая и эффективная коагуляция при очень низком значении pH и последующая стабилизация коагулированного гемоглобина. Для этого согласно этому варианту настоящего изобретения предложен способ определения в пробе количества HbA1c, по которому в случае необходимости осуществляют стадии от а) до с), причем этот способ отличается тем, что гемолиз на стадии а) осуществляют прибавлением гемолизирующего раствора (Н), причем этот гемолизирующий раствор имеет значение pH в интервале от 1 до 3 и содержит гемолитически действующее поверхностно-активное вещество и по меньшей мере один стабилизатор, причем по меньшей мере один стабилизатор выбран из фосфатидилхолина, полимера или сополимера 2-(метакрилоилоксиэтил)-2'-(триметиламмонийметил)фосфата или их смесей.

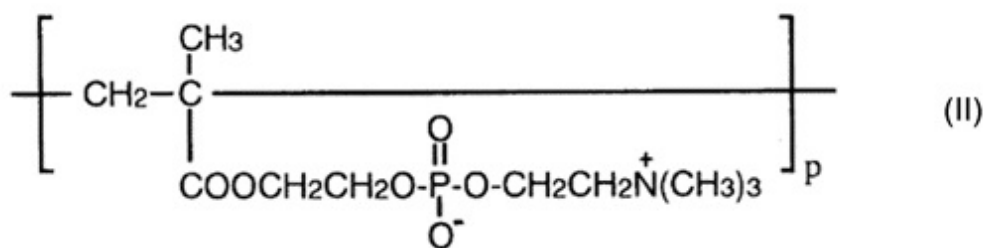
Под фосфатидилхолином в данном случае понимают соединение общей формулы (I):



где R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> выбраны из полностью насыщенных или содержащих одну или несколько ненасыщенных связей линейных или разветвленных остатков жирных кислот. В вариантах осуществления с полиненасыщенными остатками жирных кислот предпочтительными являются остатки с двумя, тремя или четырьмя ненасыщенными связями, и независимо от степени насыщения в некоторых вариантах осуществления остатки жирных кислот выбирают из остатков с длиной цепи в интервале от C<sub>8</sub> до C<sub>22</sub> или в интервале от C<sub>16</sub> до C<sub>22</sub> (например, 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин).

Под полимером или сополимером 2-(метакрилоилоксиэтил)-2'-

(триметиламмонийметил)фосфата в данном случае понимают полимер или сополимер с повторяющимися звеньями общей формулы (II):



В вариантах осуществления, в которых используют сополимеры, сополимеры наряду с указанными ранее звеньями общей формулы (II) содержат другие метакрилатные звенья, этерифицированные алифатическими или ароматическими радикалами.

После прибавления гемолизирующего раствора значение pH гемолизата соответствует значению pH гемолизирующего раствора. Такой результат достигается благодаря соответствующему буферированию гемолизирующего раствора. Так как согласно предложенному варианту настоящего изобретения гемолизирующий раствор имеет значение pH в интервале от 1 до 3, то, следовательно, значение pH гемолизированной пробы (= гемолизат) устанавливается также на значение pH в интервале от 1 до 3.

Постоянное низкое значение pH гемолизата при совместном действии со стабилизирующими поверхностно-активными веществами ведет к тому, что коагулированный гемоглобин может быть быстро и эффективно разложен.

Кроме того, предложен набор реагентов для применения в способе определения в пробе количества HbA1c, причем набор реагентов содержит по меньшей мере один гемолизирующий раствор, который содержит гемолитически действующее поверхностно-активное вещество и дополнительно полимер 2-(метакрилоилоксиэтил)-2'-(триметиламмонийметил)фосфата, фосфатидилхолин или их смеси и имеет значение pH в интервале от 1 до 3.

Смещение значения pH в интервал от 1 до 3 ведет к очень быстрой и сильной коагуляции гемоглобина. Однако, как уже было указано ранее, существует опасность того, что гемоглобин денатурируется, агглютинирует и выпадает в осадок, что, например, может быть вызвано также прибавлением трихлоруксусной кислоты. При этом авторами настоящего изобретения было найдено, что денатурирования, выпадения в осадок и агглютинации гемоглобина можно избегать тогда, когда гемолизирующий раствор дополнительно содержит 2-(метакрилоилоксиэтил)-2'-триметиламмонийметил, фосфатидилхолин или их смеси.

В связи с этим аспектом настоящего изобретения под выражением "коагуляция" понимают частичное разрушение вторичной и третичной структуры, которое, однако, не ведет к выпадению гемоглобина в осадок. Гемоглобин, коагулированный в смысле настоящего изобретения, остается в растворе в отличие от денатурированного гемоглобина. Таким образом, под денатурированным гемоглобином в смысле настоящего изобретения понимают гемоглобин, белковая структура которого была разрушена настолько, что белок выпадает в осадок и агглютинирует, что, например, происходит при обработке трихлоруксусной кислотой.

Описанная ранее сильная коагуляция гемоглобина при одновременной стабилизации коагулированного продукта происходит поразительно быстро в течение только от 5 до 15 с, и этот эффект может быть достигнут в присутствии полимера 2-(метакрилоилоксиэтил)-2'-(триметиламмонийметил)фосфата, фосфатидилхолина или их смесей в общем рабочем интервале значений pH от 1 до 3. В некоторых вариантах

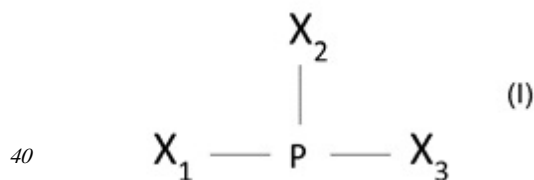
осуществления настоящего изобретения значение рН находится в интервале от 2 до 3. В одном из вариантов осуществления значение рН гемолизирующего раствора находится в интервале от 2,4 до 2,6.

### Аспект 3. Стабилизация красителя в лейкоформе

5 Другая задача, поставленная авторами настоящего изобретения, состоит в стабилизации красителя в лейкоформе в способах определения в пробе количества НбА1с, в случае которого применяют такой краситель в лейкоформе.

Под красителем в лейкоформе в данном случае следует понимать вещество, которое благодаря реакции по меньшей мере с одним окисляющим веществом и/или с веществом с пероксидазной активностью переходит из исходной бесцветной лейкоформы в окрашенную форму, приемлемую для фотометрического измерения. Примеры красителей в лейкоформе, приемлемых в смысле настоящего изобретения, представляют собой гексанатриевая соль N,N,N',N',N'',N''-гекса-(3-сульфопропил)-4,4',4''-триаминотрифенилметана (ТРМ-PS), натриевая соль N-(карбоксиметиламинокарбонил)-4,4'-бис-(диметиламино)дифениламина (DA64), натриевая соль 10-(карбоксиметиламинокарбонил)-3,7-бис-(диметиламино)фенотиазина (DA67), 2,2'-азино-бис-(3-этилбензотиазолин)-6-сульфо кислота (ABTS) и производные соединения трифениламина, фенотиазина, феноксазина, бензидина, триаллилимидазола, производные соединения о-фенилендиамина, трифенилметана и о-толуидина, обладающие указанными ранее свойствами красителя в лейкоформе, а также комбинации 4-аминоантипирина и производного соединения фенола или N,N-двузамещенного соединения анилина и комбинации 3-метилбензотиазолингидрозола (МВТН) и производного соединения анилина. Другие примеры красителей в лейкоформе, приемлемых в смысле настоящего изобретения, представляют собой производные соединения дифениламина, описанные в EP0038205, EP0124287 и EP0045220.

Согласно одному из вариантов настоящего изобретения стабилизацию красителя в лейкоформе в способе определения в пробе количества НбА1с осуществляют благодаря тому, что согласно способу осуществляют стадии от а) до с), а количественное определение гликозилированных продуктов разложения гемоглобина на стадии с) осуществляют путем их окисления посредством FPOX или FAOX с получением пероксида водорода и путем определения образующегося при этом количества пероксида водорода, причем количество пероксида водорода определяют благодаря цветной реакции красителя в лейкоформе в присутствии пероксидазы, а краситель в лейкоформе готовят в растворе, который для стабилизации красителя содержит соединение общей формулы (I):



где Р означает атом фосфора, а X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> и X<sub>3</sub> независимо друг от друга выбраны из замещенных или незамещенных линейных или разветвленных C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкилов, замещенных или незамещенных циклогексиллов и замещенных или незамещенных фенильных радикалов.

Как уже было указано ранее, принцип красителей в лейкоформе состоит в том, что определение вещества осуществляют благодаря тому, что краситель в лейкоформе вследствие присутствия определяемого вещества переходит из своей бесцветной исходной

лейкоформы в окрашенную форму. Для обеспечения того, чтобы это превращение не происходило уже до протекания непосредственной реакции определения, важно, чтобы краситель в лейкоформе был стабилизирован в своей бесцветной восстановленной форме без оказания вредного воздействия на непосредственную реакцию определения.

5 Авторами настоящего изобретения обнаружено, что благодаря прибавлению соединений общей формулы (I) может достигаться эффективная стабилизация красителей в лейкоформе без оказания мешающего влияния или вредного воздействия на непосредственную реакцию определения (в данном случае на определение пероксида водорода в присутствии фермента пероксидазы).

10 Примеры соединений общей формулы (I) представляют собой трис-(2-карбоксиэтил) фосфатин (ТСЕР), дикалиевая соль бис-(*p*-сульфонатофенил)фенилфосфиндигидрата, 1,3,5-триаза-7-фосфинадамантан, натриевая соль трис-(3-сульфонатофенил) фосфингидрата, тринатриевая соль трис-(4,6-диметил-3-сульфонатофенил) фосфингидрата, трис-(гидроксиметил)фосфин, ди-трет-бутил-(3-сульфонатопропил) фосфин, натриевая соль дифенил-(*m*-сульфонатофенил)фосфиндигидрата, хлорид [2-дициклогексилфосфино)этил]триметиламмония без обязательного осуществления  
15 настоящего изобретения с этими соединениями, указанными только в качестве примеров.

Для стабилизации красителя в лейкоформе альтернативно могут быть прибавлены также тиосоединения, предпочтительно в виде одного или нескольких тиоспиртов,  
20 простых тиоэфиров, тиокетонов или их смесей. Примеры таких тиосоединений представляют собой тиодигликоль, тиояблочная кислота, тионикотинамид, тио-NAD и их смеси без какого-либо обязательного ограничения настоящего изобретения, обусловленного указанием этих примеров.

Указанные тиосоединения могут быть использованы по отдельности или в  
25 комбинации с другими указанными ранее соединениями общей формулы (I). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения краситель в лейкоформе готовят в растворе, который для стабилизации красителя содержит по меньшей мере одно соединение общей формулы (I), такое как, например, ТСЕР, и по меньшей мере одно тиосоединение, такое как, например, тиодигликоль.

30 В соответствии с этим настоящая заявка относится также к набору реагентов для применения в способе определения в пробе количества HbA<sub>1c</sub>, отличающемуся тем, что он содержит по меньшей мере один раствор реагентов, содержащий краситель в лейкоформе и по меньшей мере одно соединение общей формулы (I) и/или по меньшей мере одно тиосоединение для стабилизации красителя в лейкоформе.

35 В одном из вариантов осуществления концентрация стабилизирующего соединения общей формулы (I) на моль красителя в лейкоформе, содержащегося в растворе реагентов, находится в интервале от 10 до 20 моль. В особых вариантах осуществления количество стабилизирующего соединения общей формулы (I) находится в интервале от 10 до 15 моль на моль красителя в лейкоформе.

40 В случае описанных ранее способов определения в пробе количества HbA<sub>1c</sub> часто используют реагенты, содержащие SH-группы, такие как, например, указанные ранее тиосоединения. Однако такие соединения, содержащие SH-группы, могут мешать непосредственной реакции определения HbA<sub>1c</sub> и даже вместо FPOX или FAOX взаимодействовать с фруктозилированными аминокислотами или пептидами с  
45 образованием пероксида водорода и влиять на количественное определение образующегося при этом пероксида водорода. В этом отношении авторами настоящего изобретения показано, что в случае указанной ранее реакции определения требуется как можно в большей степени блокировать мешающие SH-группы.

Поэтому по настоящему изобретению для оптимизации непосредственной реакции определения HbA1c предложено блокировать SH-группы, мешающие этой реакции, прибавлением агента, улавливающего SH-группы, такого как, например, N-этилмалеинимид (NEM). Следовательно, прибавление агента, улавливающего SH-группы, должно осуществляться самое позднее непосредственно перед осуществлением реакции определения HbA1c.

В некоторых вариантах осуществления агент, улавливающий SH-группы, например NEM, содержится в гемолизирующем растворе. В альтернативном варианте осуществления улавливающий SH-группы агент, например NEM, содержится в растворе реагентов, который предварительно хранится и прибавляется отдельно от раствора реагентов и в котором содержится краситель в лейкоформе, стабилизированный тиоспиртом.

Способ по настоящему изобретению в случае необходимости также может быть осуществлен так, что определение концентрации общего гемоглобина осуществляют в ходе стадий а)-с) или между ними. В соответствии с этим способ предпочтительно включает стадию определения концентрации общего гемоглобина для того, чтобы концентрацию HbA1c можно было бы указывать непосредственно в качестве относительного количества, например, в ммоль/моль.

#### Специальные варианты реализации наборов реагентов

В одном из вариантов осуществления изобретения, описанного в настоящем описании, разработан набор реагентов, который в отдельных сосудах содержит по меньшей мере три следующих раствора:

- гемолизирующий раствор (H), содержащий гемолитически действующее поверхностно-активное вещество;
- первый раствор реагентов (R1), содержащий FPOX или FAOX, и
- второй раствор реагентов (R2), содержащий протеазу, причем:
  - а) гемолизирующий раствор (H) имеет значение pH в интервале от 1 до 3 и содержит полимер 2-(метакрилоилоксиэтил)-2'--(триметиламмонийметил)фосфата, фосфатидилхолин или их смеси и/или
  - б) гемолизирующий раствор (H) содержит от 100 до 5000 мкмоль/л двухвалентного иона металла, выбранного из  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ , а второй раствор реагентов (R2) содержит протеазу, протеолитическая активность которой ведет к высвобождению фруктозилвалин-гистидина или фруктозилвалина из бета-цепи гликозилированного гемоглобина со стороны концевых аминок групп, от 0,1 до 2 ммоль/л агента, хелатирующего двухвалентные ионы металлов, на 1000 ед/мл протеазы и от 0,5 до 10 ммоль/л  $Ca^{2+}$  или от 0,5 до 10 ммоль/л  $Mg^{2+}$ , причем молярное соотношение "хелатирующий агент:  $Ca^{2+}$ " или "хелатирующий агент:  $Mg^{2+}$ " находится в интервале от 1:2 до 1:20, и/или
  - с) второй раствор реагентов (R2) содержит краситель в лейкоформе и долю соединения общей формулы (I) и/или долю по меньшей мере одного тиосоединения для стабилизации этого красителя в лейкоформе.

В вариантах осуществления, в случае которых количественное определение HbA1c в конечном счете осуществляют на основе пероксида водорода, образовавшегося при реакции определения, по меньшей мере один из указанных ранее растворов реагентов содержит пероксидазу и по меньшей мере один из других растворов реагентов содержит краситель в лейкоформе. В случае этих вариантов осуществления один из растворов реагентов на выбор содержит также агент, улавливающий SH-группы, такой как,

например, NEM, причем агент, улавливающий SH-группы, содержится в одном из растворов реагентов, в котором не содержится краситель в лейкоформе.

В особом варианте осуществления настоящего изобретения набор реагентов состоит из трех растворов реагентов со следующими компонентами:

- 5 - гемолизирующий раствор, содержащий гемолитически действующее поверхностно-активное вещество, полимер 2-(метакрилоилоксиэтил)-2'-(триметиламмонийметил) фосфата, фосфатидилхолин или их смеси, соль металла для обеспечения поступления иона металла, выбранного из  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ , в потребном количестве и агент, улавливающий SH-группы, такой как, например, NEM;
- 10 - первый раствор реагентов (R1), содержащий FPOX или FAOX и пероксидазу (POD), и
- второй раствор реагентов (R2), содержащий протеазу, протеолитическая активность которой ведет к высвобождению фруктозилвалин-гистидина или фруктозилвалина из бета-цепи гликозилированного гемоглобина со стороны концевых аминок групп, соль
- 15  $Ca^{2+}$  или  $Mg^{2+}$  и агент, хелатирующий двухвалентные ионы металлов, соответственно в потребном количестве, краситель в лейкоформе и соединение общей формулы (I) и/или тиосоединение для стабилизации красителя в лейкоформе.

Для целей первоначального раскрытия сущности следует указать на то, что любые отличительные признаки, раскрытые в представленном описании, чертежах и пунктах формулы изобретения для специалистов в данной области техники, даже тогда, когда они описаны только в связи с определенными другими отличительными признаками, могут быть скомбинированы как по отдельности, так и в любом сочетании с другими раскрытыми в данном тексте отличительными признаками или группами отличительных признаков, если это не было намеренно исключено или отсутствует возможность или

25 смысл обеспечивать технические условия для такого рода комбинаций. Отказ от обширного, явно выраженного представления всех мыслимых комбинаций отличительных признаков в данном случае обуславливается только краткостью и удобочитаемостью описания.

30 При этом следует указать на то, что специалистам в данной области техники понятно, что приведенные далее примеры осуществления служат только с целью того, чтобы воспроизведенные возможные варианты осуществления настоящего изобретения показать в качестве примеров осуществления. Поэтому специалистам в данной области техники сразу понятно, что в силу этого все другие варианты осуществления, в которых

35 раскрываются указанные в формуле изобретения отличительные признаки или комбинации отличительных признаков по настоящему изобретению, также находятся в пределах защиты настоящего изобретения. Отказ от обширного, явно выраженного представления всех мыслимых вариантов осуществления в данном случае обуславливается только краткостью и удобочитаемостью описания.

#### 40 **Примеры**

##### 1. Стабилизация протеазы

а) Стабилизация протеазы, анализ способом SDS-гелевого электрофореза

Термолизиновая протеаза при хранении в жидкой форме или в реагентах по прошествии времени при 2-8°C или при более высокой температуре проявляет сильную тенденцию к автопротеолитическому расщеплению. Это обстоятельство препятствует

45 использованию протеазы в жидких стабильных реагентах в смысле требования неизменности качества в течение длительных промежутков времени. Термолизиновая протеаза зависит от  $Zn^{2+}$ , и авторам изобретения удалось показать, что инактивация

протеазы посредством хелатирующего агента при одновременной  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой структурной стабилизации делает возможным более приемлемое применение термолизина и родственных металлопротеаз для химико-клинической диагностики.

Для выявления возможной стабилизации протеазы в основную матрицу реагентов, в которой содержалась термолизиновая протеаза, вносили хелатирующий агент и  $\text{Ca}^{2+}$  в соответствующих разных количествах или соотношениях. При этом концентрации ЭДТА и кальция, применяемые в реагенте 2, представлены в приведенной далее таблице 1.

Таблица 1

Композиция	ЭДТА, мкмоль/л	$\text{Ca}^{2+}$ , ммоль/л
Е 411/13А	12	0.6
Е 411/13В	1000	6
Е 411/13С	12	6
Е 412/13А	/	6

Полученные композиции (см. таблицу выше) распределяли по порциям и хранили при 4 или 37°C в течение более 7 дней. От этих композиций отбирали соответствующие одинаковые пробы, прибавляли к ним вспомогательный буферный раствор SDS-PAGE, после денатурации белковую композицию разделяли способом SDS-PAGE и визуализировали окрашиванием бриллиантовым синим (см. фиг. 1).

Явно видно заметно более высокое количество термолизиновой протеазы в пятнах 4 и 5 по сравнению с остальными пятнами на геле. Следовательно, термолизиновая протеаза в отношении температурной независимости защищена в этой рецептуре от аутолиза отчетливо лучше, чем в других рецептурах. Сравнение композиций с номером Е411/13В показывает, что присутствие ЭДТА для защиты от аутолиза является существенным. Сравнение композиций под номерами Е411/13А и Е411/13С с композицией Е411/13В показывает, что требуется некоторое минимальное количество ЭДТА и также должны присутствовать ионы кальция в некотором минимальном количестве.

Кроме того, следующие данные подтверждают действие особой рецептуры, стабилизирующее термолизин при хранении в течение длительного промежутка времени при 4 или 37°C.

#### б) Анализ стабилизации протеазы в системе определения HbA1c

Стабилизация протеазы, показанная на фиг. 1 на уровне анализа белков, в качестве примера была воспроизведена в матрице реагентов для определения HbA1c. С этой целью в основную матрицу реагентов 2 с одним и тем же количеством сравнительной термолизиновой протеазы прибавляли ионы кальция и ЭДТА с концентрациями в разных комбинациях. Полученные композиции соответственно разделяли на порции, первично проанализированный (свежий) реагент или реагент 2 хранили в течение 11 дней при 2-8°C (вариант "11 дней/2-8°C") или реагент 2 хранили в течение 7 дней при 37°C и затем еще в течение 4 дней при 2-8°C (вариант "7 дней/37°C+4 дня/2-8°C").

Затем основные матрицы реагентов 2 проверяли с одним и тем же гемолизирующим раствором и одним и тем же реагентом 1 посредством системы химико-клинического анализатора "BM 6010c".

Для калибровки применяли набор "DiaSys Kalibratoren TruCal HbA1c net" (артикул 1 3350). По выполнении измерений и оценивания результаты определения HbA1c с разными матрицами реагентов 2, хранившимися в течение заданного времени и при разных температурах, представлены в таблице 2. При этом  $\Delta\text{mE}$  соответствует разности между установочным веществом уровня 2 и установочным веществом уровня 1 в mE.

Основные рецептуры, лежащие в основе измерений, показаны далее, причем в случае отдельных испытаний отдельные компоненты (ацетат кальция/ЭДТА) варьировали так, как представлено в приведенной далее таблице.

Гемолизирующий раствор

- 5 Глицин, 60 моль/л  
 N-Этилмалеинимид, 7,5 ммоль/л  
 Полимер 2-(метакрилоилоксиэтил)-2'-(триметиламмонийметил)фосфата, 50 г/л  
 Хлорид цинка, 1200 мкмоль/л  
 pH=2,5

10 Раствор реагентов 1

- BIS-TRIS, 100 ммоль/л  
 NaCl, 100 ммоль/л  
 GPOX, больше 0,8 ед/мл  
 POD, больше 50 ед/мл  
 pH=7,2

15 Раствор реагентов 2

- Ацетат натрия, 20 ммоль/л  
 NaCl, 100 ммоль/л  
 Ацетат кальция, концентрацию см. в таб. 2  
 20 TSEP, 0,1 ммоль/л  
 DA-67, 0,08 ммоль/л  
 Титриплекс/ЭДТА, концентрацию см. в таб. 2  
 Протеаза (термолизин), 1000 ед/мл  
 pH=5,0

- 25 При этом параметры, принятые за основу при измерении, представлены далее.

Реагент 1:	90 мкл
Реагент 2:	30 мкл
Гемолизирующая проба:	15 мкл
Стадия гемолиза:	5 мкл пробы+100 мкл гемолизирующего раствора
Длина волны (при определении HbA1c):	658 нм (главная)/805 нм (дополнительная)
Такты измерения:	22/23-41/42

Таблица 2

А) Калибровочный сигнал HbA1c									
Сопоставление разных вариантов R2 при одном и том же гемолизирующем растворе (без Zn <sup>2+</sup> )									
Условия хранения	Первичное значение			11 дней/2-8°C			7 дней/37°C+4 дня/2-8°C		
	Уровень 1	Уровень 2	ΔmE	Уровень 1	Уровень 2	ΔmE	Уровень 1	Уровень 2	ΔmE
<b>R2</b>									
6 ммоль/л Са	6,9	11,3	4,5	6,8	11,8	5,0	6,8	10,1	3,4
12 мкмоль/л ЭДТА	6,7	11,3		7,0	11,9		6,8	10,3	
6 ммоль/л Са	6,6	11,1	4,5	6,8	11,3	4,7	6,8	10,5	3,4
1 ммоль/л ЭДТА	6,6	11,1		6,7	11,5		7,0	10,2	
0,5 ммоль/л Са	6,5	11,1	4,7	6,5	11,1	4,6	6,3	10,3	4,0
12 мкмоль/л ЭДТА	6,5	11,2		6,5	11,1		6,4	10,4	
В) Калибровочный сигнал HbA1c									
Сопоставление разных вариантов R2 при одном и том же гемолизирующем растворе (с Zn <sup>2+</sup> )									
Условия хранения	Первичное значение			11 дней/2-8°C			7 дней/37°C+4 дня/2-8°C		
	Уровень 1	Уровень 2	ΔmE	Уровень 1	Уровень 2	ΔmE	Уровень 1	Уровень 2	ΔmE
<b>R2</b>									

	6 ммоль/л Са	16,7	32,9	16,1	17,1	34,1	16,9	13,4	25,8	12,5
	12 мкмоль/л ЭДТА	16,8	32,9		17,0	33,8		13,1	25,7	
	6 ммоль/л Са	29,8	70,2	40,1	29,2	69,8	41,1	19,2	52,5	32,8
	1 ммоль/л ЭДТА	29,7	69,6		29,0	70,5		19,6	52,0	
5	0,5 ммоль/л Са	30,1	71,2	41,6	21,2	46,8	25,7	12,4	26,4	14,1
	12 мкмоль/л ЭДТА	29,8	71,9		20,8	46,7		12,3	26,5	
С) Сопоставление потери сигнала со временем сравнительно с первичным значением										
Условия хранения		Первичное значение			11 дней/2-8°C			7 дней/37°C+4 дня/2-8°C		
TruCal HbA1c net		Уровень 1	Уровень 2	ΔmE	Уровень 1	Уровень 2	ΔmE	Уровень 1	Уровень 2	ΔmE
R2										
10	6 ммоль/л Са				0,5	1,3	0,8	-3,2	-7,0	-3,7
	12 мкмоль/л ЭДТА				0,2	0,9		-3,6	-7,2	
	6 ммоль/л Са				-0,6	-0,4	0,9	-10,6	-17,7	-7,3
	1 ммоль/л ЭДТА				-0,7	0,9		-10,1	-17,6	
	0,5 ммоль/л Са				-8,9	-24,4	-15,9	-17,8	-44,8	-27,5
15	12 мкмоль/л ЭДТА				-9,0	-25,2		-17,5	-45,4	

Из таблицы 2А) можно сделать вывод, что независимо от концентрации ионов кальция и ЭДТА определение HbA1c в отсутствие ионов цинка невозможно. Отличающиеся сигналы для уровня 1 и уровня 2 в случае разных условий хранения обусловлены разными концентрациями гемоглобина в обоих установочных веществах.

В таблице 2В), напротив, показана функциональность термолизина в присутствии ионов цинка при разных соотношениях ионов кальция и ЭДТА. В таблице 2С) показано снижение ΔmE отдельных установочных веществ при разных условиях хранения. Обе композиции с концентрацией 6 ммоль/л ионов кальция показывают заметно меньшее снижение сигнала в отличие от композиции с концентрацией 0,5 ммоль/л ионов кальция.

В частности, в варианте хранения "7 дней/37°C+4 дня/2-8°C" разница между двумя концентрациями кальция при одной и той же концентрации ЭДТА является значительной. Показанные здесь результаты наглядно подтверждают сохраняемость инактивированного и при этом структурно стабилизированного термолизина в жидкой матрице реагентов при разных температурах по прошествии времени, а также возможность его реактивации.

## 2. Стабилизация коагулированного гемоглобина

Для точного определения Hb или HbA1c указанная ранее эффективная коагуляция гемоглобина, как и стабилизация этой коагулированной формы имеет существенное значение. Для целей стабилизации коагулированного гемоглобина при гемолизе гемолитически действующим поверхностно-активным веществом к основной матрице гемолизирующего раствора в последующем испытании в порядке примера прибавляли полимер 2-(метакрилоилоксиэтил)-2'-(триметиламмонийметил)фосфата и при этом значение pH устанавливали в интервале от 1 до 3.

Эти разные варианты гемолизирующего раствора с добавками или без них анализировали с одними и теми же реагентами 1 и 2 на химико-клиническом анализаторе "Hitachi 912" (составы реагентов указаны аналогично пункту 1b) и для применения модифицированы соответственно описанному в таблицах). Для оценки стабильности гемолизата вручную получали гемолизат (50 мкл пробы цельной крови+1000 мкл гемолизирующего раствора (с добавкой или без добавки полимера 2-(метакрилоилоксиэтил)-2'-(триметиламмонийметил)фосфата) и сразу анализировали. Гемолизат в открытом виде помещали в прибор при 15-25°C и в разные моменты времени, максимально через 240 минут после получения гемолизата, анализировали. При этом сигнал для определения HbA1c определяли анализатором через 240 мин и сопоставляли относительно первично найденного значения HbA1c. При этом для

измерения на приборе "Hitachi 912" за основу приняты параметры, приведенные далее.

Реагент 1:	240 мкл
Реагент 3:	80 мкл
Гемолизированная проба:	40 мкл
Длина волны (при определении HbA1c):	660 нм (главная)/800 нм (дополнительная)
Такты измерения:	18-31

Результаты, представленные на фиг. 2a-d, показывают заметное увеличение стабильности для разных проб с полимером 2-(метакрилоилоксиэтил)-2'-(триметиламмонийметил)фосфата (с добавкой) по сравнению с пробами без полимера 2-(метакрилоилоксиэтил)-2'-(триметиламмонийметил)фосфата (без добавки). В частности, на фиг. 2 представлены результаты для следующих композиций:

фиг. а): TruCal HbA1c, уровень 1, без добавки;

фиг. б): TruCal HbA1c, уровень 1, с добавкой;

фиг. с): низкое значение HbA1c, средний гемоглобин, без добавки;

фиг. d): низкое значение HbA1c, средний гемоглобин, с добавкой.

На основании представленных результатов было явно показано, что прибавление полимера 2-(метакрилоилоксиэтил)-2'-(триметиламмонийметил)фосфата к гемолизирующему раствору в описанных условиях заметно улучшает стабилизацию молекулы гемоглобина, что показано 10%-ми границами (пунктирные линии соответствуют отклонению +/- 10%) относительно соответствующего первично определенного значения HbA1c.

### 3. Стабилизация красителя в лейкоформе фосфинами

С целью улучшения стабильности красителя в лейкоформе в матрице реагентов проверяли разные водорастворимые стабильные вещества в отношении их действия, стабилизирующего краситель в лейкоформе. При этом в качестве отрицательного сравнительного образца использовали состав реагента без стабилизирующей добавки, а в качестве контрольного вещества применяли 1,3,5-триаза-7-фосфадамантан, так как это вещество не соответствует требованиям к структуре.

Были получены следующие образцовые композиции реагентов:

20 mM буферный раствор Bis-Tris (бис-(2-гидроксиэтил)амино-трис-(гидроксиэтил)метан);

20 mM ацетата Na;

100 mM NaCl;

6 mM ацетата Ca;

15 г/л тритона X 405;

0,08 mM DA67 (краситель в лейкоформе);

1000 ед/мл термолизина;

1 mM ЭДТА.

Затем к указанной основной матрице реагентов без стабилизатора прибавляли разные стабилизаторы с одной и той же концентрацией. При этом аликвоту без стабилизирующего вещества использовали в качестве сравнительного образца.

Собственное поглощение соответствующей композиции реагентов при 660 нм определяли фотометрически непосредственно после получения композиции (первичное определение) и после хранения в течение 4 дней при 37°C (определение нагрузки). При этом увеличение поглощения при 660 нм по прошествии времени представляет собой меру степени превращения лейкоформы красителя в его окрашенный вариант и, таким образом, меру окислительной дестабилизации лейкоформы.

Результаты, показанные в таблице 3, получены в указанных ранее условиях.

Таблица 3. Собственное окрашивание R2 при 660 нм в мЕ

	День 0	День 4
Без стабилизатора	17,7	455
ТСЕР	15,7	37,9
Дикалиевая соль бис-(п-сульфонатофенил)фенилфосфиндигидрата	19,2	164
1,3,5-Триаза-7-фосфаадамтан	20,7	391
Натриевая соль трис-(3-сульфонатофенил)фосфиндигидрата (< 5% оксида)	18,7	251
Трис-(гидроксиметил)фосфин	19,9	239
Натриевая соль дифенил(м-сульфонатофенил)фосфиндигидрата	18,2	70
Хлорид [2-дициклогексилфосфино)этил]триметиламмония	18,6	307

#### 4. Стабилизация красителя в лейкоформе тиосоединениями

Было проверено несколько тиосоединений в отношении их действия, стабилизирующего краситель. С этой целью исследовали собственное окрашивание раствора реагентов (матрица: NaCl, ацетат Са, тритон X 405+термолизин, см. рецептуру 3), содержащего краситель в лейкоформе DA67, после хранения при 2-8°C и 37°C. При этом в случае хранения при 2-8°C были достигнуты результаты, приведенные в таблице 4.

Таблица 4. Собственное окрашивание R2 при 660 нм в мЕ

	День 0	День 2	День 8	День 10
Без добавки	50,1	136	344	463
0,1 мМ ТСЕР	20,4	23,4	48,1	106
0,2 мМ ТСЕР	14,2	18,7	41,6	97,4
2 мМ тионикотинамида	50,6	73,9	133,5	205
2 мМ тионикотинамида+0,2 мМ ТСЕР	9,6	17	41,5	91,8
4 мМ тионикотинамида	55,7	79,9	122	209
2 мМ тио-NAD	74,3	138	215	292
4 мМ тио-NAD	97,9	139	203	274
4 мМ тионикотинамида+0,1 мМ ТСЕР	26,7	36,3	55,5	106
2 мМ тио-NAD+0,2 мМ ТСЕР	11,1	34,6	56,6	105
4 мМ тио-NAD+0,1 мМ ТСЕР	21,3	46,3	68,3	128

В случае хранения при 37°C были достигнуты результаты, приведенные в таблице 5.

Таблица 5. Собственное окрашивание R2 при 660 нм в мЕ

	День 0	День 2	День 8	День 10
Без добавки	50,1	610	2220	2513
0,1 мМ ТСЕР	20,4	23,4	66,2	646
0,2 мМ ТСЕР	14,2	18,7	31,9	295
2 мМ тионикотинамида	50,6	73,9	233	671
2 мМ тионикотинамида+0,2 мМ ТСЕР	9,6	17	41,5	29,7
4 мМ тионикотинамида	55,7	79,9	215	704
2 мМ тио-NAD	74,3	138	366	1174
4 мМ тио-NAD	97,9	139	305	893
4 мМ тионикотинамида+0,1 мМ ТСЕР	26,7	36,3	55,5	48,8
2 мМ тио-NAD+0,2 мМ ТСЕР	11,1	34,6	56,6	51,5
4 мМ тио-NAD +0,1 мМ ТСЕР	21,3	46,3	68,3	109

#### 5. Стабилизация красителя в лейкоформе посредством ТСЕР в комбинации с тиосоединениями

Было проверено несколько тиосоединений в отношении их действия, стабилизирующего краситель, при применении в комбинации с ТСЕР. С этой целью исследовали собственное окрашивание раствора реагентов (матрица: буферный раствор,

NaCl, ацетат Ca, тритон X 405+термолизин), содержащего краситель в лейкоформе DA67, после хранения при 2-8°C и 37°C. При этом в случае хранения при 2-8°C были достигнуты результаты, приведенные в таблицах 6а и 6б.

Таблица 6а. Собственное окрашивание R2 при 660 нм в мЕ

5

	День 0	День 2	День 8	День 10
Без добавки	128	564	940	1124
2 мМ S-NAD	228	437	657	832
2 мМ тионикотинамида	73	189	268	319
2 мМ NAD	62	619	1248	1508
2 мМ тиомочевины	85	514	844	1056
1% 2,2-тиодигликоля	96	211	299	357
0,1 мМ ТСЕР	89	111	129	266
2,2-тиодигликоль+ТСЕР, 0,1 мМ	83	92	104	170

10

Таблица 6б. Собственное окрашивание R2 при 660 нм в мЕ (разделенная композиция)

15

	День 0	День 2	День 8	День 10
Без добавки	115	323	848	1154
2 мМ ацетил-NAD	169	1097	1869	2037
2 мМ тиояблочной кислоты	91	114	158	197

20

В случае хранения при 37°C были достигнуты результаты, приведенные в таблице 7а и 7б.

Таблица 7а. Собственное окрашивание R2 при 660 нм в мЕ

25

	День 0	День 2	День 8	День 10
Без добавки	128	957	2583	2821
2 мМ S-NAD	228	437	662	1591
2 мМ тионикотинамида	73	189	292	862
2 мМ NAD	62	1220	2717	2940
2 мМ тиомочевины	85	514	594	2152
1% 2,2-тиодигликоля	96	211	494	1730
0,1 мМ ТСЕР	89	111	219	1350
2,2-тиодигликоль+ТСЕР, 0,1 мМ	83	92	104	272

30

Таблица 7б. Собственное окрашивание R2 при 660 нм в мЕ (разделенная композиция)

35

	День 0	День 2	День 8	День 10
Без добавки	115	1183	2714	2885
2 мМ ацетил-NAD	169	1097	2024	3209
2 мМ тиояблочной кислоты	91	114	188	341

#### 6. Стабилизирующее сигнал действие тиодигликоля, применяемого индивидуально или в сочетании с ТСЕР

40

Были исследованы калибровочные сигналы HbA1c в присутствии тиодигликоля, применяемого индивидуально или в сочетании с ТСЕР.

К основной матрице реагента 2 (составы реагентов указаны аналогично пункту 1б) и для применения модифицированы соответственно описанному в таблицах) прибавляли 10 г/л β-тиодигликоля и к порциям этой основной матрицы прибавляли ТСЕР с соответствующими разными концентрациями.

45

Затем варианты реагента 2 с соответствующим одним и тем же гемолизирующим раствором и реагентом 1 анализировали на приборе "BM 6010". С этой целью применяли набор "DiaSys Kalibratoren TruCal HbA1c net" (артикул 1 3350). При этом соответственно анализировали и оценивали определение HbA1.

Параметры, принятые за основу при измерении на приборе "BM 6010c", представлены далее.

Реагент 1:	90 мкл
Реагент 3:	30 мкл
Гемолизирующая проба:	15 мкл
Стадия гемолиза:	5 мкл пробы+100 мкл гемолизирующего раствора
Длина волны (при определении HbA1c):	658 нм (главная)/805 нм (дополнительная)
Такты измерения:	22/23-41/42

При этом были достигнуты результаты, приведенные в таблице 8.

Таблица 8

Калибровочный сигнал HbA1c Сопоставление разных концентраций ТСЕР при одном и том же количестве β-тиодигликоля									
Партия реагента	Первичное значение			7 дней/2-8°C			7 дней/37°C		
	Уровень 1	Уровень 2	ΔmE	Уровень 1	Уровень 2	ΔmE	Уровень 1	Уровень 2	ΔmE
10 г/л β-тиодигликоля без ТСЕР	28,3	66,0	37,8	25,2	60,4	35,2	18,7	48,1	29,4
10 г/л β-тиодигликоля 0,1 ммоль/л ТСЕР	26,9	66,1	39,2	23,7	56,5	32,8	22,5	56,2	33,7
10 г/л β-тиодигликоля 0,2 ммоль/л ТСЕР	26,4	64,5	38,1	22,1	52,3	30,3	21,8	54,8	33,0
10 г/л β-тиодигликоля 0,3 ммоль/л ТСЕР	25,9	64,3	38,4	19,6	48,8	29,2	22,5	56,2	34,8
10 г/л β-тиодигликоля 0,4 ммоль/л ТСЕР	24,9	62,9	38,0	18,1	46,1	28,0	21,1	54,7	33,6
10 г/л β-тиодигликоля 0,5 ммоль/л ТСЕР	24,5	61,8	37,3	16,6	42,4	25,8	20,5	54,6	34,0

Явно наблюдается затухание сигнала определения HbA1c в варианте "7 дней/2-8°C", а также в варианте "7 дней/37°C" тогда, когда используют только тиодигликоль. Представленные результаты напротив ясно подтверждают пользу от комбинирования ТСЕР и тиодигликоля при разных концентрациях ТСЕР.

#### (57) Формула изобретения

1. Способ определения количества гликозилированного гемоглобина (HbA1c) в пробе, в котором осуществляют следующие стадии:

а) гемолиз эритроцитов в пробе для высвобождения содержащегося в них HbA1c;  
 б) приведение в контакт HbA1c, высвобожденного на стадии а), с протеолитически действующим агентом для получения гликозилированных продуктов разложения гемоглобина;

в) определение количества HbA1c за счет количественного определения гликозилированных продуктов разложения гемоглобина, полученных на стадии б); отличающийся тем, что протеолитический агент, применяемый на стадии б), активируется благодаря смешиванию двух разных растворов, причем один из растворов имеет значение pH в интервале от 1 до 8 и содержит:

i) металлопротеазу;

ii) соответственно от 0,1 до 2 ммоль/л агента, хелатирующего двухвалентные ионы металлов, на 1000 ед./мл металлопротеазы и

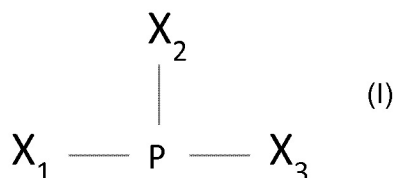
iii) от 0,5 до 10 ммоль/л Ca<sup>2+</sup> или 0,5 до 10 ммоль/л Mg<sup>2+</sup>;

причем молярное соотношение "хелатирующий агент: Ca<sup>2+</sup>" или "хелатирующий агент: Mg<sup>2+</sup>" находится в интервале от 1:2 до 1:20, а другой раствор содержит от 100 до 5000 мкмоль/л двухвалентного иона металла, выбранного из Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup>.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что раствор, содержащий от 100 до 5000 мкмоль/л двухвалентного иона металла, выбранного из  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ , представляет собой гемолизирующий раствор, который на стадии а) прибавляют к пробе, причем этот гемолизирующий раствор содержит гемолитически действующее

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что гемолиз на стадии а) осуществляют прибавлением гемолизирующего раствора (Н), причем гемолизирующий раствор содержит гемолитически действующее поверхностно-активное вещество и полимер 2-(метакрилоилоксиэтил)-2'--(триметиламмонийметил)фосфата, фосфатидилхолин или их смеси и имеет значение рН в интервале от 1 до 3.

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что количественное определение гликозилированных продуктов разложения гемоглобина на стадии с) осуществляют путем их окисления посредством фруктозилпептидоксидазы или фруктозиламиноацилоксидазы с получением пероксида водорода и путем определения образующегося при этом количества пероксида водорода, причем количество пероксида водорода определяют благодаря цветной реакции красителя в лейкоформе в присутствии пероксидазы, а краситель в лейкоформе готовят в растворе, который для стабилизации красителя содержит соединение общей формулы (I)



где Р означает атом фосфора, а  $\text{X}_1$ ,  $\text{X}_2$  и  $\text{X}_3$  независимо друг от друга выбраны из замещенных или незамещенных линейных или разветвленных  $\text{C}_1$ - $\text{C}_8$ -алкилов, замещенных или незамещенных циклогексиллов и замещенных или незамещенных фенильных радикалов.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что раствор, содержащий краситель в лейкоформе, для стабилизации красителя содержит по меньшей мере одно тиосоединение.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что по меньшей мере одно тиосоединение выбрано из тиодигликоля, тиояблочной кислоты, тионикотинамида, тио-NAD и их смесей.

7. Способ по п.5 или 6, отличающийся тем, что до проведения определения количества  $\text{HbA1c}$  на стадии с) к реакционной смеси прибавляют агент, улавливающий SH-группы.

8. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что в ходе стадий а)-с) или между ними осуществляют определение концентрации общего гемоглобина.

9. Набор реагентов для применения в способе определения в пробе количества  $\text{HbA1c}$ , отличающийся тем, что набор реагентов содержит по меньшей мере два разных раствора в отдельных сосудах, причем один из растворов имеет значение рН в интервале от 1 до 8 и содержит металлопротеазу и от 0,1 до 2 ммоль/л агента, хелатирующего двухвалентные ионы металлов, на 1000 ед./мл металлопротеазы и от 0,5 до 10 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  или от 0,5 до 10 ммоль/л  $\text{Mg}^{2+}$ , причем молярное соотношение "хелатирующий агент:  $\text{Ca}^{2+}$ " или "хелатирующий агент:  $\text{Mg}^{2+}$ " находится в интервале от 1:2 до 1:20, а другой раствор содержит от 100 до 5000 мкмоль/л двухвалентного иона металла, выбранного из  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ .

10. Набор реагентов по п.9, отличающийся тем, что он в отдельных сосудах содержит

по меньшей мере следующие растворы:

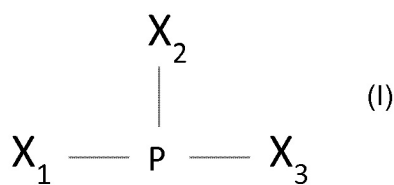
- гемолизирующий раствор (Н), содержащий гемолитически действующее поверхностно-активное вещество и от 100 до 5000 мкмоль/л двухвалентного иона металла, выбранного из  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ ;

- первый раствор реагентов (R1), содержащий фруктозилпептидоксидазу или фруктозиламиноацилоксидазу и пероксидазу, и

- второй раствор реагентов (R2), дополнительно содержащий металлопротеазу и от 0,1 до 2 ммоль/л агента, хелатирующего двухвалентные ионы металлов, на 1000 ед./мл металлопротеазы и от 0,5 до 10 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  или от 0,5 до 10 ммоль/л  $\text{Mg}^{2+}$ , причем молярное соотношение "хелатирующий агент:  $\text{Ca}^{2+}$ " или "хелатирующий агент:  $\text{Mg}^{2+}$ " находится в интервале от 1:2 до 1:20, и краситель в лейкоформе.

11. Набор реагентов по п.9 или 10, отличающийся тем, что раствор (Н) представляет собой гемолизирующий раствор, который содержит гемолитически действующее поверхностно-активное вещество и дополнительно полимер 2-(метакрилоилоксиэтил)-2'-(триметиламмонийметил)фосфата, фосфатидилхолин или их смеси и имеет значение рН в интервале от 1 до 3.

12. Набор реагентов по п.10 или 11, отличающийся тем, что раствор (R2) для стабилизации красителя в лейкоформе содержит по меньшей мере одно соединение общей формулы (I)



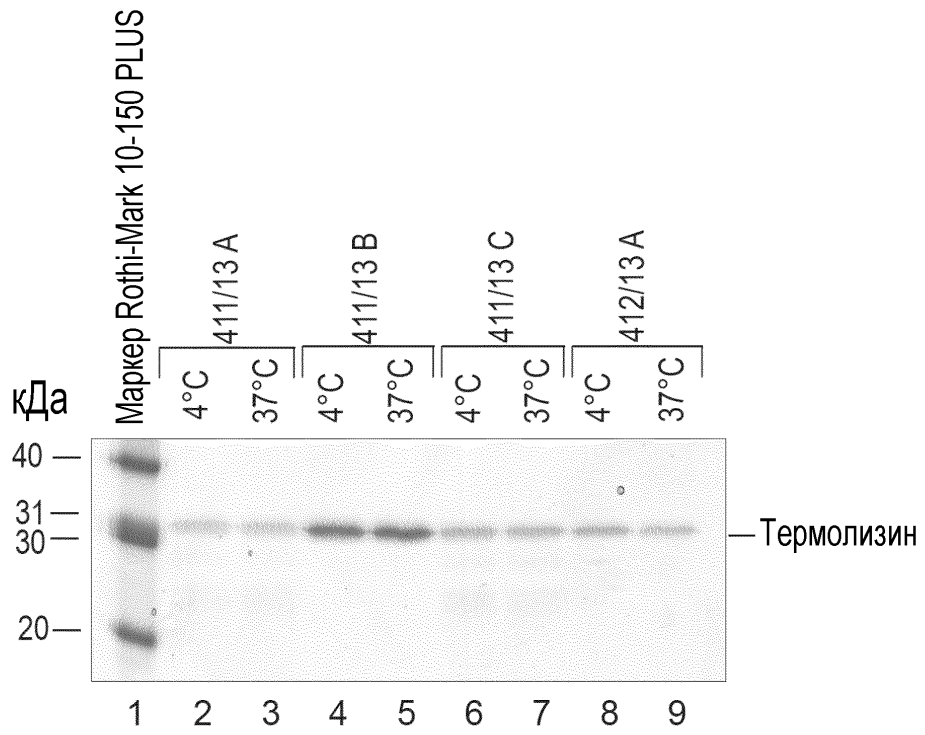
где Р означает атом фосфора, а  $\text{X}_1$ ,  $\text{X}_2$  и  $\text{X}_3$  независимо друг от друга выбраны из замещенных или незамещенных линейных или разветвленных  $\text{C}_1$ - $\text{C}_8$ -алкилов, замещенных или незамещенных циклогексиллов и замещенных или незамещенных фенильных радикалов.

13. Набор реагентов по любому из пп. 10-12, отличающийся тем, что раствор (R2) для стабилизации красителя в лейкоформе содержит по меньшей мере одно тиосоединение, причем по меньшей мере один тиоспирт предпочтительно выбран из тиодигликоля, тиояблочной кислоты, тионикотинамида, тио-NAD и их смесей.

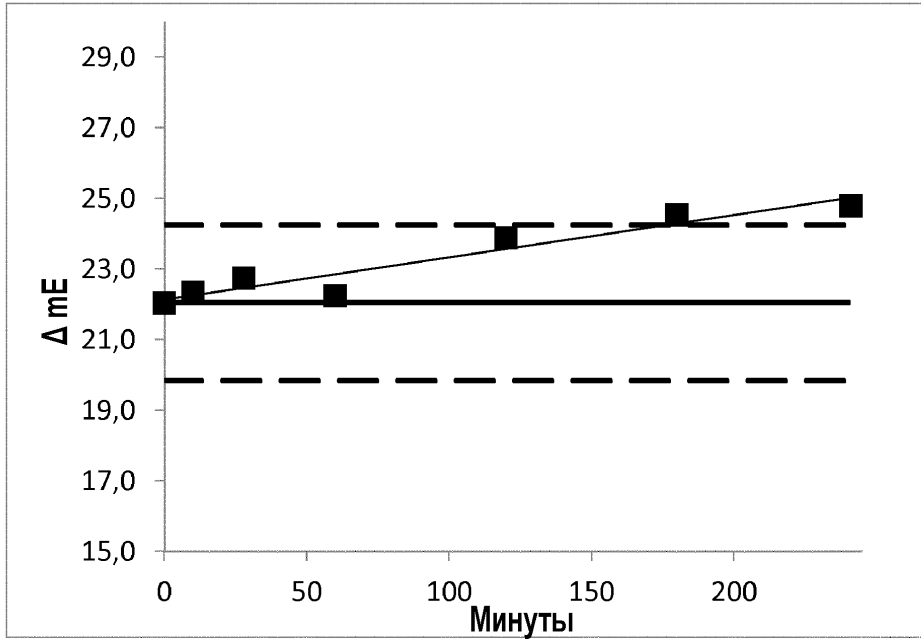
14. Набор реагентов по любому из пп. 10-13, отличающийся тем, что раствор (R1) содержит агент, улавливающий SH-группы, причем агент, улавливающий SH-группы, предпочтительно представляет собой N-этилмалеинимид.

15. Набор реагентов по любому из пп. 10-14, отличающийся тем, что его используют в способе по любому из пп. 1-8.

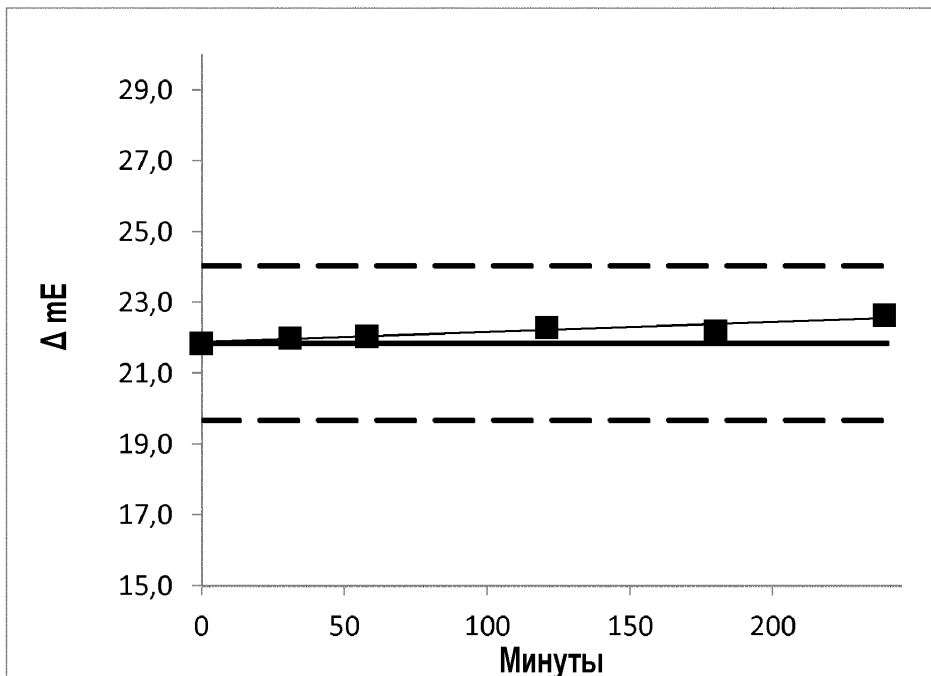
ФИГ.1



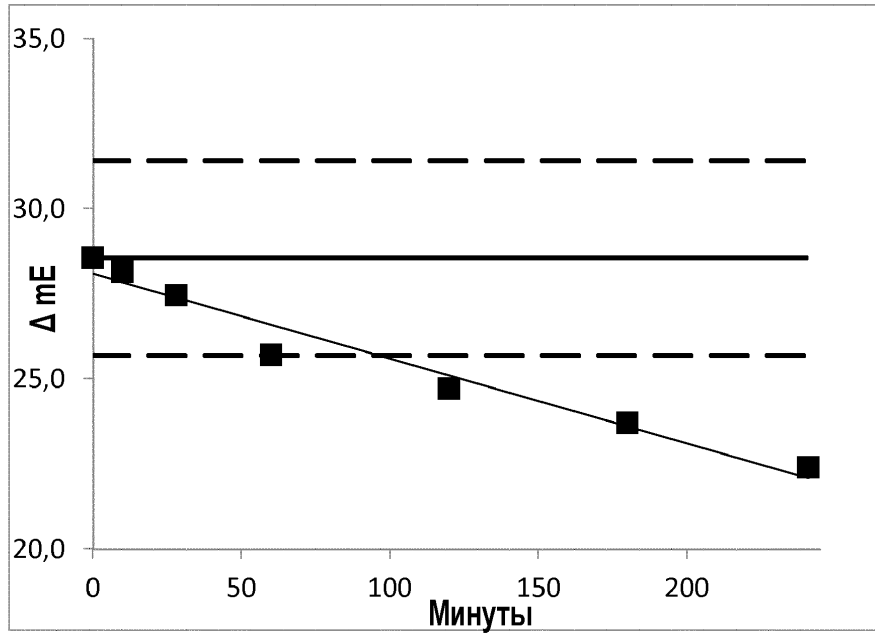
ФИГ.2а



ФИГ.2б



ФИГ.2с



ФИГ.2d

