

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 836**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/545** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.09.2019** **PCT/JP2019/036235**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2020** **WO20066722**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2019** **E 19866240 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024** **EP 3859338**

54 Título: **Reactivo de ensayo de hemoglobina, kit de ensayo y método de ensayo**

30 Prioridad:

**26.09.2018 JP 2018179952**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.11.2024**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**YUI, MEGUMI y**  
**MAKINODAN, MITSURU**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 987 836 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

Reactivo de ensayo de hemoglobina, kit de ensayo y método de ensayo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un reactivo de medición de la hemoglobina y a un método de medición.

10 **Antecedentes de la técnica**

La detección de la sangre contenida en muestras biológicas tales como de heces, orina y saliva son útiles para el diagnóstico de muchas enfermedades. Por ejemplo, para detectar el cáncer colorrectal, se utiliza una prueba de sangre oculta en las heces para detectar sangre en las heces. Un método inmunológico para detectar la hemoglobina contenida en la sangre oculta en una muestra biológica tal como de heces por medio de un anticuerpo anti-hemoglobina se conoce como método para detectar la sangre oculta.

La muestra biológica que se va a utilizar para una prueba de sangre oculta generalmente es recogida por un sujeto en un recipiente que contiene una solución de conservación y enviada a un centro de análisis, tal como un hospital. En muchos casos, una solución de conservación que contiene una muestra biológica se almacena durante varios días hasta que se utiliza realmente para una prueba y, a menudo, se coloca en un entorno de alta temperatura durante ese período. La hemoglobina es inestable en solución, y se desnaturaliza y degrada con especial facilidad en condiciones de altas temperaturas. En caso de que una estructura de un epítipo o un sitio circundante al mismo cambie debido a la desnaturalización o degradación de la hemoglobina, un anticuerpo no puede reconocer la hemoglobina. Por consiguiente, la precisión de la detección de hemoglobina mediante un método inmunológico disminuye.

Por lo tanto, se utiliza un método para añadir haptoglobina a una solución de conservación de muestras biológicas (por ejemplo, referencia de patente 1) para estabilizar la hemoglobina. La haptoglobina es una proteína presente en la sangre de una amplia selección de animales y desempeña la función de recuperar la hemoglobina liberada en la sangre debido a la hemólisis de los glóbulos rojos. Se sabe que la haptoglobina se une rápidamente de forma irreversible a la hemoglobina para formar un complejo estable de hemoglobina y haptoglobina. En caso de haberse añadido previamente haptoglobina a una solución de conservación o similar, la hemoglobina contenida en la muestra se estabiliza mediante un complejo de hemoglobina y haptoglobina que se forma cuando la muestra biológica se añade a una solución de conservación o similar.

Sin embargo, en caso de añadirse haptoglobina, en especial cuando se añade a la muestra biológica una cantidad excesiva de haptoglobina con respecto a la hemoglobina libre, a veces se detecta una disminución de un valor medido de hemoglobina (Referencia de patente 1 y 2).

40 **Lista de citas**40 **Bibliografía de patentes**

[Referencia de patente 1] Publicación de patente japonesa no examinada n.º H10-132824

[Referencia de patente 2] Publicación de patente japonesa n.º 2010014586

45 **Sumario de la invención****Problema técnico**

Un objeto de la presente invención es proporcionar un reactivo de medición de hemoglobina y un método de medición capaz de inhibir una disminución en un valor medido de hemoglobina debido a la adición de haptoglobina para medir con mayor precisión la cantidad de hemoglobina.

55 **Solución del problema**

Los presentes inventores han llevado a cabo amplios estudios para resolver los problemas descritos anteriormente de la técnica relacionada. Como resultado, han descubierto que es posible inhibir una disminución en un valor medido de hemoglobina debido a la adición de haptoglobina haciendo coexistir un portador insoluble al que se une un anticuerpo anti-hemoglobina y un portador insoluble al que se une un anticuerpo anti-haptoglobina, y que la cantidad de hemoglobina se puede medir con mayor precisión, y han completado la presente invención.

Es decir, la presente invención se refiere a, por ejemplo, cada una de las siguientes invenciones.

[1] Un reactivo para medir una cantidad total de hemoglobina, en donde la cantidad total de hemoglobina es la cantidad total de un complejo de hemoglobina y haptoglobina y una hemoglobina libre, que comprende: una partícula portadora insoluble inmovilizadora de un anticuerpo anti-hemoglobina; y una partícula portadora insoluble inmovilizadora de un

anticuerpo anti-haptoglobina.

[2] El reactivo de acuerdo con [1], en donde el reactivo es adecuado para medir una cantidad total de hemoglobina a través de un método de inmunoaglutinación.

[3] El reactivo de acuerdo con [1] o [2], en donde el número de tipos de anticuerpos anti-hemoglobina es de al menos dos y/o en donde el número de tipos de anticuerpos anti-haptoglobina es de uno.

[4] El reactivo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3], en donde los portadores insolubles son partículas de látex y/o partículas de oro coloidal.

[5] El reactivo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [4], en donde el anticuerpo anti-hemoglobina y el anticuerpo anti-haptoglobina son anticuerpos monoclonales.

[6] El reactivo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [5], en donde la hemoglobina que se va a ensayar comprende un complejo de hemoglobina y haptoglobina seleccionado entre un complejo intermedio de hemoglobina y haptoglobina y un complejo completo de hemoglobina y haptoglobina, o la combinación de los mismos.

[7] Un método para medir la hemoglobina en una muestra biológica, comprendiendo el método: una etapa de poner una muestra biológica en contacto con una partícula portadora insoluble inmovilizadora de un anticuerpo anti-hemoglobina y una partícula portadora insoluble inmovilizadora de un anticuerpo anti-haptoglobina para provocar inmunoaglutinación.

[8] El método de medición de hemoglobina de acuerdo con [7], que comprende: una etapa (1) de mezclar una muestra biológica con haptoglobina y formar un complejo de hemoglobina y haptoglobina para obtener una muestra que contenga el complejo de hemoglobina y haptoglobina; y una etapa (2) de poner en contacto la muestra obtenida en la etapa (1) con el portador insoluble inmovilizador de un anticuerpo anti-hemoglobina y el portador insoluble inmovilizador de un anticuerpo anti-haptoglobina para provocar inmunoaglutinación.

[9] El método de medición de acuerdo con [7] u [8], en donde el número de tipos de anticuerpos anti-hemoglobina es de al menos dos y/o en donde el número de tipos de anticuerpos anti-haptoglobina es de uno.

[10] El método de medición de acuerdo con uno cualquiera de [7] a [9], en donde los portadores insolubles son partículas de látex y/o partículas de oro coloidal.

[11] El método de medición de acuerdo con uno cualquiera de [7] a [10], en donde el anticuerpo anti-hemoglobina y el anticuerpo anti-haptoglobina son anticuerpos monoclonales.

[12] El método de medición de acuerdo con uno cualquiera de [7] a [11], en donde la muestra biológica es de heces, saliva u orina.

[13] El método de medición de acuerdo con uno cualquiera de [7] a [12], en donde la haptoglobina está contenida en una solución de conservación de muestras biológicas, preferentemente en donde una concentración de haptoglobina en la solución de conservación de muestras biológicas es de 0,05 unidades/l a 50 unidades/l.

[14] El método de medición de acuerdo con uno cualquiera de [7] a [13], en donde la hemoglobina de la muestra biológica contiene al menos una seleccionada del grupo que consiste en hemoglobina libre, un complejo intermedio de hemoglobina y haptoglobina, y un complejo completo de hemoglobina y haptoglobina, y en donde al menos una parte de la hemoglobina libre forma el complejo intermedio de hemoglobina y haptoglobina y/o el complejo completo de hemoglobina y haptoglobina junto con la haptoglobina después de la etapa (1).

## Efectos ventajosos de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un reactivo de medición y un método de medición capaz de medir con mayor precisión la cantidad de hemoglobina.

## Descripción de las realizaciones

### <Definición>

[Complejo de hemoglobina y haptoglobina]

La hemoglobina es una proteína presente en los glóbulos rojos y tiene una estructura tetramérica [ $\alpha_2\beta_2$ ] que consiste en dos conjuntos de dos subunidades denominadas subunidad  $\alpha$  (o cadena  $\alpha$ ) y subunidad  $\beta$  (o cadena  $\beta$ ). La haptoglobina es una proteína, que está presente en el plasma y que se une a la hemoglobina liberada en la sangre, y tiene tres tipos de estructuras. Por ejemplo, la haptoglobina de tipo 1-1 tiene una estructura tetramérica [ $\alpha_2\beta_2$ ] que consiste en dos conjuntos de dos subunidades denominadas subunidad  $\alpha$  (o cadena  $\alpha$ ) y subunidad  $\beta$  (o cadena  $\beta$ ).

La hemoglobina y la haptoglobina forman un complejo estable. En general, una molécula de hemoglobina se une a una molécula de haptoglobina. Un complejo de este tipo se denomina complejo de hemoglobina y haptoglobina y, en la presente memoria descriptiva, también se denomina complejo completo de hemoglobina y haptoglobina.

Por otro lado, en caso de que una relación molar (hemoglobina: haptoglobina) de la hemoglobina con respecto a la haptoglobina se vuelve menor que 1, es decir, en un caso en que la haptoglobina esté presente en una cantidad excesiva con respecto a la hemoglobina, tiende a formarse un complejo denominado complejo intermedio de hemoglobina y haptoglobina (J. V. PASTEWKA *et al.*, Biochimica et Biophysica Acta, 386 (1975) 530-537). Al formarse el complejo intermedio de hemoglobina y haptoglobina, se cree que una molécula de hemoglobina tetramérica [ $\alpha_2\beta_2$ ] se disocia en dos moléculas de dímeros ( $\alpha\beta$ ), y cada dímero  $\alpha\beta$  se une a una molécula de haptoglobina. Es decir, se cree que el complejo intermedio de hemoglobina y haptoglobina es un complejo en el que 1/2 molécula de hemoglobina

( $\alpha\beta$ ) se une a una molécula de haptoglobina [ $\alpha_2\beta_2$ ].

En la presente memoria descriptiva, el complejo de hemoglobina y haptoglobina contiene tanto un complejo completo de hemoglobina y haptoglobina como un complejo intermedio de hemoglobina y haptoglobina, a menos que se especifique lo contrario.

[Muestra biológica]

La muestra de la presente memoria descriptiva es una muestra biológica que se toma de un objeto de prueba y contiene o puede contener hemoglobina. La muestra biológica puede ser de heces, saliva u orina, y preferentemente de heces. Además, se puede utilizar sangre entera, suero, plasma o similares como muestra biológica, y la medición de la cantidad de hemoglobina de la misma puede ser útil como un índice de, por ejemplo, hemólisis o tratamiento utilizando una preparación de haptoglobina.

[Muestra]

La muestra de la presente memoria descriptiva contiene una muestra biológica y se obtiene particularmente mezclando una muestra biológica con haptoglobina. La hemoglobina libre de una muestra biológica forma un complejo estable de hemoglobina y haptoglobina al mezclarse con haptoglobina.

Es decir, la hemoglobina libre que no ha formado un complejo con la haptoglobina, un complejo de hemoglobina y haptoglobina (complejo de hemoglobina y haptoglobina derivado de una muestra biológica) que estaba originalmente presente en la muestra biológica y/o un complejo de hemoglobina y haptoglobina (complejo de hemoglobina y haptoglobina preparado) formado por la adición de haptoglobina puede estar contenido en la muestra.

En particular, en la muestra obtenida mezclando una muestra biológica con haptoglobina, se forma preferentemente un complejo de hemoglobina y haptoglobina preparado de manera que toda la hemoglobina libre forme un complejo con la haptoglobina, y la muestra consiste preferentemente en un complejo de hemoglobina y haptoglobina derivado de una muestra biológica y un complejo de hemoglobina y haptoglobina preparado, desde el punto de vista de la estabilidad.

La muestra se obtiene de manera que, por ejemplo, un sujeto o similar recoge una muestra biológica, a continuación, la muestra biológica se añade inmediatamente a una solución de conservación de muestras (en adelante, denominada "solución de conservación" según las circunstancias) que contiene haptoglobina. La muestra puede conservarse a temperatura normal durante varios días hasta la medición de la hemoglobina, y se conserva preferentemente en un refrigerador a una temperatura entre 2 °C y 10 °C. En caso de que la muestra biológica sea de heces o similar que contenga una materia sólida, se puede retirar la materia sólida filtrando la solución de conservación y utilizarse como muestra.

[Solución de conservación]

La solución de conservación significa una solución de conservación de muestras biológicas para conservar una muestra biológica y que preferentemente contiene haptoglobina.

Es preferible que la solución de conservación contenga además una solución tampón o similar. La solución de conservación o similar puede ser una solución tampón que contenga un buen agente tampón tal como ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES), ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil-etanosulfónico (HEPES) o ácido piperazin-1,4-bis(2-etanosulfónico) (PIPES), o puede ser una solución tampón de fosfato, una solución tampón tris o una solución tampón de glicina. El pH de una solución de conservación puede ser de 5 a 10 o de 6 a 8.

La concentración de haptoglobina en la solución de conservación depende del tipo y la cantidad de muestra biológica, y algunos ejemplos incluyen de 0,05 unidades/l a 50 unidades/l, 0,1 unidades/l a 10 unidades/l o 0,2 unidades/l a 2 unidades/l. En este caso, una unidad significa una cantidad de haptoglobina que se une a 1 mg de hemoglobina. La concentración de haptoglobina en los intervalos descritos anteriormente es una concentración suficiente para hacer que toda la hemoglobina de una muestra forme un complejo con la haptoglobina.

Por ejemplo, en caso de que las heces se suspendan en una solución de conservación de manera que la concentración de heces llegue a ser del 0,05 % al 25 % (% en p/v) con respecto a 0,2 a 20 ml de la solución de conservación, la proporción de la cantidad de haptoglobina en una muestra biológica puede ser de 0,075 g/unidad a 5000 g/unidad.

La haptoglobina de la presente invención no está particularmente limitada siempre que se combine con la hemoglobina que se va a analizar para generar un complejo de hemoglobina y haptoglobina. Dado que la especificidad de la especie de la unión de la hemoglobina con la haptoglobina es baja, se puede utilizar una amplia selección de haptoglobina. Cuando la hemoglobina humana es una diana de medición, puede utilizarse haptoglobina derivada de seres humanos, caballos, cerdos, monos, perros, conejos y ratas. No es necesario utilizar haptoglobina altamente purificada.

Los aditivos bien conocidos, por ejemplo, los agentes antibacterianos tales como la azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ), ajustadores de pH y sales para ajustar la fuerza iónica, que se pueden utilizar para conservar la hemoglobina se pueden añadir además a una solución de conservación. Un agente antibacteriano incluye antibióticos y enzimas líticas. Los ejemplos de aditivos incluyen componentes bien conocidos, por ejemplo, aminoácidos tales como la lisina y la histidina, albúmina, un inhibidor de la proteasa, un complejo hidrosoluble de iones de metales de transición y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), que se sabe que tienen un efecto estabilizador sobre la hemoglobina. Los ejemplos de albúmina incluyen albúmina sérica, tal como la albúmina sérica bovina (ASB) y la albúmina (ovoalbúmina) derivada de la clara de huevo.

#### <Reactivo para la medición de hemoglobina>

El reactivo de medición de hemoglobina de una realización de la presente invención incluye: un portador insoluble inmovilizador de un anticuerpo anti-hemoglobina; y un portador insoluble inmovilizador de un anticuerpo anti-haptoglobina. Se utiliza un método inmunológico como método de medición en el que se utiliza el reactivo de la presente invención. El método inmunológico puede ser un método inmunológico bien conocido que utiliza un anticuerpo anti-hemoglobina, y algunos ejemplos del mismo incluyen un método de inmunoaglutinación (por ejemplo, un método de aglutinación de látex o un método de aglutinación de oro coloidal), inmunocromatografía y un método ELISA. En particular, el reactivo de la presente invención se utiliza adecuadamente para un método de inmunoaglutinación y más preferentemente para un método de aglutinación de látex.

Un reactivo de medición de hemoglobina de una realización de la presente invención mide la cantidad total de hemoglobina utilizando tanto hemoglobina libre como un complejo de hemoglobina y haptoglobina como diana de medición durante la medición. El reactivo de la presente invención presenta casi la misma reactividad que la hemoglobina para cada antígeno de hemoglobina libre, un complejo completo de hemoglobina y haptoglobina y un complejo intermedio de hemoglobina y haptoglobina en un método de medición inmunológica (en particular, un método de inmunoaglutinación). En particular, debido a la coexistencia del anticuerpo anti-haptoglobina unido a un portador insoluble, se presenta un excelente efecto al mostrar la misma reactividad que la hemoglobina ("reactividad equivalente a la hemoglobina") ante ambos antígenos de un complejo completo de hemoglobina y haptoglobina y de un complejo intermedio de hemoglobina y haptoglobina.

La "misma reactividad que la hemoglobina" significa que, en caso de que cada antígeno de hemoglobina libre, un complejo completo de hemoglobina y haptoglobina, un complejo intermedio de hemoglobina y haptoglobina, o una mezcla de los mismos, esté presente en una muestra como hemoglobina en concentraciones iguales, las concentraciones de hemoglobina medidas a través de una reacción de inmunoaglutinación de portadores insolubles son sustancialmente iguales en cada antígeno. En este caso, cuando las concentraciones de hemoglobina medidas a través de una reacción de inmunoaglutinación de portadores insolubles son "sustancialmente iguales", significa que, en caso de que el valor medido de hemoglobina libre sea del 100 %, un límite inferior de un valor medido de la concentración de hemoglobina cuando se miden otros antígenos que tienen una concentración idéntica de hemoglobina es mayor o igual al 80 %, preferentemente mayor o igual al 90 % y más preferentemente mayor o igual al 95 %, y un valor límite superior del valor medido es menor o igual al 120 %, preferentemente menor o igual al 110 % y más preferentemente menor o igual al 105 %.

Debido a la incorporación de un portador insoluble inmovilizador de un anticuerpo anti-haptoglobina además de un portador insoluble inmovilizador de un anticuerpo anti-hemoglobina en la técnica relacionada en el reactivo de la presente invención, se puede inhibir la disminución de un valor medido de hemoglobina provocada por la adición de haptoglobina en la técnica relacionada. En particular, incluso en caso de que la relación molar (hemoglobina/haptoglobina) de hemoglobina libre en una muestra biológica con respecto a la haptoglobina que se va a añadir sea inferior a 1, es decir, en caso de que esté presente un complejo intermedio de hemoglobina y haptoglobina, se puede inhibir la disminución de un valor medido de hemoglobina y se puede detectar y medir con precisión la hemoglobina en la muestra biológica. Por otra parte, en caso de que no se añada haptoglobina a una muestra biológica, incluso si la haptoglobina (independientemente de la haptoglobina libre, un complejo intermedio de hemoglobina y haptoglobina o un complejo de hemoglobina y haptoglobina) estaba originalmente presente en la muestra biológica, se puede inhibir la disminución de un valor medido de hemoglobina y se puede detectar y medir con precisión la hemoglobina en la muestra biológica.

Los presentes inventores consideran que la existencia de un complejo intermedio de hemoglobina y haptoglobina es una de las causas de la disminución de un valor medido de hemoglobina provocada por la adición de haptoglobina en la técnica relacionada y han resuelto este problema añadiendo un portador insoluble inmovilizador de un anticuerpo anti-haptoglobina.

Se puede utilizar un portador insoluble que pueda inmovilizar un anticuerpo anti-hemoglobina o un anticuerpo anti-haptoglobina. Se prefieren las partículas insolubles que se pueden utilizar para un método inmunológico, y entre sus ejemplos se incluyen partículas metálicas coloidales tales como partículas de oro coloidal, partículas de látex, partículas de sílice, partículas magnéticas, partículas fluorescentes y glóbulos rojos, aunque la presente invención no se limita a las mismas. Como partículas insolubles, se prefieren las partículas de látex, y más preferentemente, las partículas de látex de poliestireno. Los portadores insolubles están preferentemente en forma de partículas. Su

diámetro promedio de partícula es preferentemente de 5 a 1000 nm, más preferentemente de 30 a 500 nm, y aún más preferentemente de 75 a 350 nm, pero los portadores insolubles se pueden utilizar sin estar particularmente limitados a estos intervalos.

- 5 La inmovilización de un anticuerpo significa que un anticuerpo se une (inmoviliza) a través de la adsorción física o la unión química a la superficie de un portador insoluble. Como método de inmovilización (método de unión), por ejemplo, los anticuerpos se pueden mezclar con partículas portadoras insolubles y se pueden adsorber físicamente sobre las superficies de las partículas portadoras insolubles para unir los anticuerpos a las partículas portadoras insolubles, que es una tecnología bien conocida. Además, en caso de utilizarse partículas portadoras insolubles en las que se introduzca un grupo amino o un grupo carboxilo en las superficies, los anticuerpos pueden unirse a las superficies de las partículas portadoras insolubles a través de un enlace químico en el que se utilice un reactivo de glutaraldehído o carboxiimida.

- 10 La cantidad de anticuerpos inmovilizados no está particularmente limitada, sino que puede ser de 0,5 a 2000 µg/mg de látex, y puede ser de 1 a 1000 µg/mg de látex o de 2 a 500 µg/mg de látex. La cantidad de anticuerpos inmovilizados se puede calcular con una cantidad obtenida restando la cantidad de anticuerpos después de la unión de la cantidad de anticuerpos previa a la unión a los portadores insolubles.

- 15 Aunque no está particularmente limitado, un anticuerpo anti-hemoglobina puede reconocer un epítipo de hemoglobina en un complejo de hemoglobina y haptoglobina, y preferentemente no reaccionar de forma cruzada con la haptoglobina. Un anticuerpo anti-hemoglobina puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal, pero es preferentemente un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo monoclonal anti-hemoglobina humana desde el punto de vista de la especificidad. El número de tipos de anticuerpos anti-hemoglobina contenidos en un reactivo de medición es al menos uno y preferentemente al menos dos.

- 20 Por otro lado, aunque no está particularmente limitado, un anticuerpo anti-haptoglobina puede reconocer un epítipo de haptoglobina en un complejo de hemoglobina y haptoglobina, y preferentemente no reaccionar de forma cruzada con la hemoglobina. En particular, un anticuerpo anti-haptoglobina preferentemente no se aglutina con la haptoglobina libre en un portador insoluble en el que el anticuerpo anti-haptoglobina está inmovilizado, al menos en el intervalo de la cantidad de haptoglobina libre utilizada para formar un complejo de hemoglobina y haptoglobina. Por otra parte, un anticuerpo anti-haptoglobina preferentemente no se aglutina en absoluto con la haptoglobina libre en un portador insoluble en el que el anticuerpo anti-haptoglobina está inmovilizado. Un anticuerpo anti-haptoglobina puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal, pero es preferentemente un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo monoclonal anti-haptoglobina. En caso de que un anticuerpo anti-haptoglobina sea un anticuerpo monoclonal, un sitio de reconocimiento del mismo puede ser una cadena  $\alpha$  (anticuerpo de reconocimiento de cadena  $\alpha$ ) o una cadena  $\beta$  (anticuerpo de reconocimiento de cadena  $\beta$ ) de haptoglobina. El número de tipos de anticuerpos anti-haptoglobina contenidos en un reactivo de medición es al menos uno.

- 25 Las especies animales de las que se derivan los anticuerpos descritos anteriormente que se pueden utilizar en la presente invención no están particularmente limitadas, pero algunos ejemplos de las mismas incluyen anticuerpos derivados de animales tales como conejos, cabras, ratones, ratas, caballos y ovejas. Se puede utilizar tanto un anticuerpo policlonal obtenido a partir del suero de un animal inmunizado con una diana de medición como un anticuerpo monoclonal obtenido mediante la fusión de células del bazo de un animal inmunizado con una diana de medición con células de mieloma a través de un método bien conocido. Además, se pueden utilizar fragmentos de los mismos [por ejemplo, F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fab' o Fv].

- 30 El número de tipos de portadores insolubles utilizados para inmovilizar anticuerpos anti-hemoglobina es al menos uno, pero pueden ser al menos dos. Uno o más tipos de anticuerpos anti-hemoglobina pueden movilizarse en un tipo de portador insoluble. Además, un tipo de anticuerpo anti-hemoglobina puede inmovilizarse en uno o más tipos de portadores insolubles.

- 35 En el caso de que dos o más tipos de anticuerpos anti-hemoglobina estén contenidos en un reactivo de medición, los dos o más tipos de anticuerpos anti-hemoglobina pueden inmovilizarse en un portador insoluble idéntico. Como alternativa, se pueden combinar y utilizar varios tipos de portadores insolubles en los que se inmoviliza un tipo de anticuerpo anti-hemoglobina sobre un tipo de portador insoluble. En este momento, los portadores insolubles utilizados para inmovilizar diferentes tipos de anticuerpos anti-hemoglobina pueden ser el mismo tipo de portadores insolubles o pueden ser diferentes tipos de portadores insolubles que tengan diferentes materiales, diámetros de partículas o similares.

- 40 El número de tipos de portadores insolubles utilizados para inmovilizar anticuerpos anti-haptoglobina es al menos uno, pero pueden ser al menos dos. Se pueden inmovilizar uno o más tipos de anticuerpos anti-haptoglobina en un tipo de portador insoluble. Además, un tipo de anticuerpo anti-haptoglobina puede inmovilizarse en uno o más tipos de portadores insolubles. En el caso de que dos o más tipos de anticuerpos anti-haptoglobina estén contenidos en un reactivo de medición, lo mismo se aplica al caso descrito anteriormente, donde dos o más tipos de anticuerpos anti-hemoglobina están contenidos en un reactivo de medición.

La forma del reactivo de medición no está particularmente limitada, aunque puede ser, por ejemplo, un sistema de dos reactivos que consista en un reactivo (primer reactivo) que no contenga ningún portador insoluble y un reactivo (segundo reactivo) que contenga un portador insoluble (portador insoluble inmovilizador de anticuerpos) que inmovilice un anticuerpo, o puede ser un sistema de un reactivo que consista únicamente en un reactivo que contenga un portador insoluble inmovilizador de anticuerpos.

El primer reactivo se puede utilizar para ajustar un entorno de medición, por ejemplo, puede utilizarse como diluyente desde el punto de vista de, por ejemplo, ajustar la concentración de una diana de medición o un contaminante o ajustar la velocidad de reacción en un sistema de reacción. El segundo reactivo contiene un portador insoluble inmovilizador de anticuerpos y se mezcla con el primer reactivo y una muestra para provocar una reacción de inmovilización. El primer y segundo reactivo pueden contener adecuadamente un agente tampón de pH, una sal, un tensioactivo, un acelerador de agregación, un conservante y similares. El pH del mismo en el momento de una reacción de aglutinación es preferentemente de 5 a 9.

Además, se mezcla un reactivo de medición con una solución de conservación, obteniéndose una solución de reacción. La concentración de portadores insolubles en la solución de reacción se puede seleccionar adecuadamente de un intervalo de, por ejemplo, 0,0001 mg/ml a 10 mg/ml de acuerdo con los diámetros de partículas de los portadores insolubles que se van a utilizar o el diseño de todo el sistema de medición. La concentración de portadores insolubles que inmovilizan anticuerpos anti-hemoglobina en un reactivo de medición puede ser de 0,01 a 20 mg/ml o de 0,05 a 1 mg/ml, y la concentración de portadores insolubles que inmovilizan anticuerpos anti-haptoglobina puede ser de 0,01 a 20 mg/ml o de 0,05 a 1 mg/ml.

La concentración de portadores insolubles en un segundo reactivo se diluye mezclándolo con una solución de conservación o mezclando un primer reactivo con una solución de conservación cuando está en uso. Por lo tanto, la concentración de los portadores insolubles en el segundo reactivo se puede seleccionar adecuadamente dependiendo del aumento de la dilución. Por ejemplo, la concentración se puede ajustar adecuadamente de modo que sea de 0,004 mg/ml a 80 mg/ml en un caso de dilución doble y de 0,06 mg/ml a 120 mg/ml en un caso de dilución triple.

<Método de medición de la hemoglobina>

[Etapa (1)]

En una etapa (1), se mezcla una muestra biológica con haptoglobina y se forma un complejo de hemoglobina y haptoglobina, obteniéndose una muestra que contiene el complejo de hemoglobina y haptoglobina.

La mezcla de una muestra biológica con haptoglobina se realiza como se describe en el apartado de la [Muestra] descrita anteriormente. En este caso, el complejo de hemoglobina y haptoglobina contenido en la muestra puede contener tanto un complejo completo de hemoglobina y haptoglobina como un complejo intermedio de hemoglobina y haptoglobina. La muestra también puede contener hemoglobina libre derivada de una muestra, un complejo de hemoglobina y haptoglobina derivado de una muestra, y otros componentes derivados de una muestra, y puede contener además haptoglobina libre que no forma un complejo con la hemoglobina. La haptoglobina que se va a mezclar con una muestra biológica puede estar contenida en una solución de conservación de muestras biológicas y, en caso de añadirse haptoglobina a una muestra biológica de forma que la que la haptoglobina esté contenida en una solución de conservación de muestras biológicas, la muestra también puede contener otros componentes de una solución de conservación además de la haptoglobina libre que no forma un complejo con la hemoglobina. Dado que es preferible que toda la hemoglobina libre derivada de una muestra forme un complejo con la haptoglobina, la cantidad de haptoglobina que se debe mezclar con una muestra puede ser una cantidad excedente con respecto a la hemoglobina libre de una muestra biológica.

[Etapa (2)]

En una etapa (2), se pone en contacto la muestra obtenida en la etapa (1) con el portador insoluble inmovilizador de un anticuerpo anti-hemoglobina y el portador insoluble inmovilizador de un anticuerpo anti-haptoglobina para provocar una reacción de inmovilización.

El anticuerpo anti-hemoglobina reconoce la hemoglobina en la muestra debido al contacto descrito anteriormente, mediante el cual el portador insoluble inmovilizador de un anticuerpo anti-hemoglobina se une a la hemoglobina o a un complejo de hemoglobina y haptoglobina, y los portadores insolubles se aglutinan además entre sí. La turbidez de una solución cambia debido a la aglutinación de los portadores insolubles. Por lo tanto, el cambio en la turbidez de una solución para obtener la concentración de hemoglobina en una muestra utilizando una curva de calibración creada utilizando hemoglobina o un complejo de hemoglobina y haptoglobina con una concentración de hemoglobina conocida.

Los ejemplos de métodos de medición para el cambio en la turbidez incluyen un método para medir la absorbancia, luz dispersa, o similar, de una solución de inmunorreacción a través de una técnica óptica. Como técnica óptica, por ejemplo, se puede utilizar un dispositivo de análisis óptico de uso general. Por ejemplo, el ensayo se puede realizar

utilizando un analizador clínico bioquímico automatizado "JCA-BM2250" (fabricado por JEOL Ltd.) o "JCA-BM6070" (fabricado por JEOL Ltd.)

Al poner en contacto con la muestra en el método de medición de la presente invención un portador insoluble inmovilizador de un anticuerpo anti-haptoglobina además de un portador insoluble inmovilizador de un anticuerpo anti-hemoglobina en la técnica relacionada, se puede inhibir la disminución de un valor medido de hemoglobina provocada por la adición de haptoglobina en la técnica relacionada y se puede detectar y medir con mayor precisión la hemoglobina en una muestra. En caso de no añadirse haptoglobina a una muestra durante la medición de hemoglobina en la muestra (es decir, en caso de no realizarse la etapa (1)), incluso aunque la haptoglobina (independientemente de la haptoglobina libre, un complejo intermedio de hemoglobina y haptoglobina o un complejo completo de hemoglobina y haptoglobina) esté presente originalmente en la muestra, la muestra se puede poner en contacto con un portador insoluble inmovilizador un anticuerpo anti-hemoglobina y un portador insoluble inmovilizador un anticuerpo anti-haptoglobina y se puede provocar una inmuoaglutinación (es decir, solo la etapa (2)) para inhibir la disminución de un valor medido de hemoglobina, y detectar y medir con precisión la hemoglobina en la muestra.

La presente invención proporciona además un kit que se puede utilizar para detectar hemoglobina en una muestra mediante el método descrito anteriormente. El kit puede incluir un reactivo de medición que contenga un portador insoluble inmovilizador de anticuerpos anti-hemoglobina y un portador insoluble inmovilizador de anticuerpos anti-haptoglobina, haptoglobina (preferentemente una solución de conservación que contenga haptoglobina), un calibrador, un control y similares, y puede incluir una herramienta y un recipiente para recoger una muestra, una solución de conservación para conservar una muestra y similares.

#### [Ejemplos]

<Ejemplos 1-1 a 4-2 y Ejemplo comparativo 1>

[Preparación de reactivos de medición]

Se prepararon el primer y segundo reactivo como reactivos de medición.

Se utilizó una solución tampón de HEPES 50 mM (pH de 7,4) como primer reactivo.

Se mezclaron la solución tampón de HEPES 50 mM (pH de 7,4), partículas de látex de poliestireno inmovilizadoras de anticuerpos respectivos de diferentes tipos de anticuerpos monoclonales anti-hemoglobina (anticuerpos anti-Hb) y partículas de látex de poliestireno inmovilizadoras de anticuerpos monoclonales anti-haptoglobina en concentraciones que se muestran en la Tabla 1 para preparar reactivos para medir la reacción de inmuoaglutinación de los Ejemplos 1-1 a 1-4 y el Ejemplo comparativo 1 que tuvieran las concentraciones finales de látex que se muestran en la Tabla 1, como segundo reactivo. De manera similar, se mezclaron entre sí las sustancias en concentraciones predeterminadas para preparar reactivos a fin de medir la reacción de inmuoaglutinación de los Ejemplos 2-1 a 2-3, los Ejemplos 3-1 a 3-3 y los Ejemplos 4-1 a 4-2 con concentraciones finales de látex que se muestran en la Tabla 2, como segundos reactivos.

Se utilizó AO-53 (reconocimiento de cadena  $\alpha$ ), AO-27 (reconocimiento de cadena  $\alpha$ ), AO-35 (reconocimiento de cadena  $\alpha$ ) o AN12-8 (reconocimiento de cadena  $\beta$ ) como anticuerpo monoclonal anti-haptoglobina. Se utilizaron anticuerpos anti-haptoglobina en los que se confirmó que las cantidades de haptoglobina libre añadidas como en el apartado de [Preparación de muestras] que figura a continuación no se aglutinaron con portadores insolubles inmovilizadores de los anticuerpos anti-haptoglobina.

Se prepararon partículas de látex de poliestireno inmovilizadoras de anticuerpos mediante un método bien conocido. Es decir, se mezcló cada anticuerpo monoclonal anti-hemoglobina o anticuerpo monoclonal anti-haptoglobina con partículas de látex de poliestireno (diámetro de partícula promedio de 200 nm) y se inmovilizó en las superficies de las partículas de látex de poliestireno para preparar partículas de látex de poliestireno inmovilizadoras de anticuerpos.

[Tabla 1]

Anticuerpo	Concentración de látex (mg/ml) en el segundo reactivo				
	Ejemplo comparativo 1	Ejemplo 1-1	Ejemplo 1-2	Ejemplo 1-3	Ejemplo 1-4
Anticuerpo anti-Hb	0,69	0,69	0,69	0,69	0,69
AO-53		0,08	0,15	0,23	0,31



[Tabla 2]

Anticuerpo	Concentración de látex (mg/ml) en el segundo reactivo							
	Ejemplo 2-1	Ejemplo 2-2	Ejemplo 2-3	Ejemplo 3-1	Ejemplo 3-2	Ejemplo 3-3	Ejemplo 4-1	Ejemplo 4-2
Anticuerpo anti-Hb	0,69	0,69	0,69	0,69	0,69	0,69	0,69	0,69
AO-27	0,08	0,15	0,31					
AO-35				0,08	0,15	0,31		
AN12-8							0,08	0,15

## [Preparación de muestras]

- 5 Se mezclaron hemoglobina humana (Hbh) purificada a partir de sangre humana y haptoglobina humana (Hph) (haptoglobina de fenotipo humano 1-1 (fabricada por SIGMA Corporation)) con un diluyente calibrador de Hb "Eiken" (fabricado por Eiken Chemical Co., Ltd.) para obtener las concentraciones que se muestran en la Tabla 3 para preparar las muestras n.º 0 a 6. En la muestra n.º 3, se mezclan 0,8 unidades/l de haptoglobina humana con 800 µg/l de hemoglobina humana, y toda la hemoglobina y la haptoglobina forman complejos completos de hemoglobina y haptoglobina.

## [Inmunoaglutinación]

- 15 Se añadieron respectivamente los reactivos de medición de los Ejemplos 1-1 a 1-4, Ejemplos 2-1 a 2-3, Ejemplos 3-1 a 3-3, Ejemplos 4-1 y 4-2 y el Ejemplo comparativo 1 a las muestras n.º 0 a 6, y se midió la turbidez con un analizador clínico automatizado BM2250 para calcular los valores de conversión de la concentración de hemoglobina basándose en la curva de calibración que se ha creado de antemano. Por otra parte, también se calcularon los valores relativos (%) de hemoglobina con respecto a la muestra n.º 0 (muestra que no contiene haptoglobina humana). Los resultados se muestran en la Tabla 3.

- 20 Las condiciones de medición en JCA-BM2250 son las siguientes.

Cantidad de muestra: 2,0 µl

Primer reactivo: 60 µl

Segundo reactivo: 30 µl

- 25 Longitud de onda de medición: 658 nm

[Tabla 3]

N.º	Hbh (µg/l)	Hph (unidades/l)	Resultados	Ejemplo 1-1	Ejemplo 1-2	Ejemplo 1-3	Ejemplo 1-4	Ejemplo 2-1	Ejemplo 2-2	Ejemplo 2-3
0	800	0	Valor de conversión de la concentración de Hbh (µg/l)	879	904	906	891	881	880	863
1	800	0,267		870	890	888	899	865	867	841
2	800	0,533		874	875	890	879	837	856	838
3	800	0,8		842	867	877	864	818	831	830
4	800	1,067		843	874	868	862	822	819	827
5	800	1,333		830	850	873	851	812	829	836
6	800	1,6		814	845	857	825	795	815	833
0	800	0	Valor relativo de Hbh con respecto a la muestra n.º 0	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
1	800	0,267		99 %	98 %	98 %	101 %	98 %	98 %	97 %
2	800	0,533		99 %	97 %	98 %	99 %	95 %	97 %	97 %
3	800	0,8		96 %	96 %	97 %	97 %	93 %	94 %	96 %
4	800	1,067		96 %	97 %	96 %	97 %	93 %	93 %	96 %
5	800	1,333		94 %	94 %	96 %	95 %	92 %	94 %	97 %
6	800	1,6		93 %	93 %	95 %	93 %	90 %	93 %	96 %

(continuación)

N.º	Hbh (µg/l)	Hph (unidades/l)	Resultados	Ejemplo 3-1	Ejemplo 3-2	Ejemplo 3-3	Ejemplo 4-1	Ejemplo 4-2	Ejemplo comparativo 1
0	800	0	Valor de conversión de la concentración de Hbh (µg/l)	899	900	869	878	891	893
1	800	0,267		875	860	854	866	881	853
2	800	0,533		850	841	823	871	873	826
3	800	0,8		820	816	804	848	882	794
4	800	1,067		801	799	795	844	885	787
5	800	1,333		798	807	801	847	898	795
6	800	1,6		760	784	798	855	903	724
0	800	0	Valor relativo de Hbh con respecto a la muestra n.º 0	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
1	800	0,267		97 %	96 %	98 %	99 %	99 %	96 %
2	800	0,533		95 %	94 %	95 %	99 %	98 %	92 %
3	800	0,8		91 %	91 %	92 %	97 %	99 %	89 %
4	800	1,067		89 %	89 %	91 %	96 %	99 %	88 %
5	800	1,333		89 %	90 %	92 %	96 %	101 %	89 %
6	800	1,6		84 %	87 %	92 %	97 %	101 %	81 %

De la Tabla 3 se desprende claramente que, cada uno de los ejemplos, en los que se añadió látex inmovilizador de un anticuerpo anti-haptoglobina junto con látex inmovilizador de un anticuerpo anti-hemoglobina, y que fueron casos en los que se añadió haptoglobina al medir la hemoglobina, pueden inhibir la disminución de un valor de ensayo de hemoglobina debido a la adición de haptoglobina, es decir, se puede obtener un valor medido más cercano al valor real en comparación con el Ejemplo comparativo 1 en el que solo se añade látex inmovilizador de un anticuerpo anti-hemoglobina, pero no se añade látex inmovilizador de un anticuerpo anti-haptoglobina. Estos resultados se obtuvieron utilizando el anticuerpo anti-haptoglobina que era de reconocimiento de cadena  $\alpha$  o de reconocimiento de cadena  $\beta$ , demostrando que los resultados no dependían de las subunidades reconocidas por los anticuerpos anti-haptoglobina.

<Ejemplos comparativos 2-1 a 2-3, 3-1 a 3-3 y 4 a 7>

Se prepararon reactivos obtenidos mezclando anticuerpos anti-haptoglobina libres que no estaban inmovilizados en látex en lugar del látex inmovilizador de anticuerpos anti-haptoglobina del Ejemplo 1-1 con látex inmovilizador de anticuerpos anti-hemoglobina, y se añadieron a las muestras n.º 0 a 6 para provocar de manera similar reacciones de aglutinación, y se calcularon los valores de conversión de la concentración de hemoglobina y los valores relativos (%) de hemoglobina. En la Tabla 4, se muestran las composiciones de los reactivos de cada uno de los ejemplos comparativos, y los resultados se muestran en la Tabla 5. Los anticuerpos anti-haptoglobina AN11-2 y AN12-3 eran anticuerpos monoclonales anti-haptoglobina de reconocimiento de cadena  $\beta$ , y se prepararon a través de un método bien conocido.

De la Tabla 5 se desprende que, incluso añadiendo anticuerpos anti-haptoglobina libres que no se hubieran unido al látex, no fue posible inhibir la disminución del valor medido de hemoglobina debido a la adición de haptoglobina. En cambio, se mostró una tendencia a que los valores fueran disminuyendo. Se supone que esto probablemente se deba a que la unión entre los anticuerpos anti-hemoglobina unidos al látex y los complejos de hemoglobina y haptoglobina fue inhibida por el exceso de anticuerpos anti-hemoglobina.

[Tabla 4]

	Anticuerpo	Ejemplo comparativo 2-1	Ejemplo comparativo 2-2	Ejemplo comparativo 2-3	Ejemplo comparativo 3-1	Ejemplo comparativo 3-2
Concentración de látex (mg/ml)	Anticuerpo anti-Hb	0,69	0,69	0,69	0,69	0,69
Concentración de anticuerpo anti-haptoglobina (µg/ml)	AO-53	5	10	20		
	AN11-2				5	10
	AN12-3					
	AO-27					
	AO-35					
Concentración de látex (mg/ml)	AN12-8					
	Anticuerpo	Ejemplo comparativo 3-3	Ejemplo comparativo 4	Ejemplo comparativo 5	Ejemplo comparativo 6	Ejemplo comparativo 7
	Anticuerpo anti-Hb	0,69	0,69	0,69	0,69	0,69
	AO-53					
	AN11-2	20				
Concentración de anticuerpo anti-haptoglobina (µg/ml)	AN12-3		20			
	AO-27			20		
	AO-35				20	
	AN12-8					20

[Tabla 5]

N.º	Hbh (µg/l)	Hbh (unidades/l)	Resultados	Ejemplo comparativo 1	Ejemplo comparativo 2-1	Ejemplo comparativo 2-2	Ejemplo comparativo 2-3	Ejemplo comparativo 3-1	Ejemplo comparativo 3-2
0	800	0	Concentración de Hbh	893	884	884	906	892	894
1	800	0,267		853	826	804	809	838	824
2	800	0,533		826	756	739	755	788	758
3	800	0,8	Valor de conversión (µg/l)	794	695	682	660	713	662
4	800	1,067		787	663	642	623	688	622
5	800	1,333		795	640	608	598	675	582
6	800	1,6	Valor relativo de Hbh con respecto a la muestra n.º 0	724	506	471	437	543	412
0	800	0		100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
1	800	0,267		96 %	93 %	91 %	89 %	94 %	92 %
2	800	0,533	Valor relativo de Hbh con respecto a la muestra n.º 0	92 %	85 %	84 %	83 %	88 %	85 %
3	800	0,8		89 %	79 %	77 %	73 %	80 %	74 %
4	800	1,067		88 %	75 %	73 %	69 %	77 %	70 %
5	800	1,333	Resultados	89 %	72 %	69 %	66 %	76 %	65 %
6	800	1,6		81 %	57 %	53 %	48 %	61 %	46 %
N.º	Hbh (µg/l)	Hbh (unidades/l)		Ejemplo comparativo 3-3	Ejemplo comparativo 4	Ejemplo comparativo 5	Ejemplo comparativo 6	Ejemplo comparativo 7	
0	800	0	Valor de conversión de la concentración de Hbh (µg/l)	911	896	887	880	879	
1	800	0,267		811	818	837	818	832	
2	800	0,533		703	741	824	768	751	
3	800	0,8	Valor relativo de Hbh con respecto a la muestra n.º 0	589	652	807	715	698	
4	800	1,067		533	608	799	693	670	
5	800	1,333		482	579	804	669	648	
6	800	1,6	Resultados	323	405	766	569	523	
0	800	0		100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	
1	800	0,267		89 %	91 %	94 %	93 %	95 %	
2	800	0,533	Valor relativo de Hbh con respecto a la muestra n.º 0	77 %	83 %	93 %	87 %	85 %	
3	800	0,8		65 %	73 %	91 %	81 %	79 %	
4	800	1,067		58 %	68 %	90 %	79 %	76 %	
5	800	1,333	Resultados	53 %	65 %	91 %	76 %	74 %	
6	800	1,6		35 %	45 %	86 %	65 %	60 %	

<Ejemplos 5-1 a 5-5 y Ejemplo comparativo 8>

[Preparación de reactivos de medición]

- 5 Se prepararon un primer y un segundo reactivo como reactivos de medición.

Se utilizó una solución tampón de HEPES 50 mM (pH de 7,4) como primer reactivo.

- 10 Se mezclaron la solución tampón de HEPES 50 mM (pH de 7,4), partículas de látex de poliestireno inmovilizadoras de anticuerpos respectivos de diferentes tipos de anticuerpos monoclonales anti-hemoglobina (anticuerpos anti-Hb) y partículas de látex de poliestireno inmovilizadoras de anticuerpos monoclonales anti-haptoglobina en concentraciones que se muestran en la Tabla 6 para preparar reactivos para medir la reacción de inmunoaglutinación de los Ejemplos 5-1 a 5-5 y el Ejemplo comparativo 8 que tuvieran las concentraciones finales de látex que se muestran en la Tabla 6, como segundo reactivo.

- 15 Se utilizó AO-53 (reconocimiento de cadena  $\alpha$ ) o AN12-8 (reconocimiento de cadena  $\beta$ ) como anticuerpo monoclonal anti-haptoglobina. Se utilizaron anticuerpos anti-haptoglobina en los que se confirmó que las cantidades de haptoglobina libre añadidas como en el apartado de [Preparación de muestras] que figura a continuación no se aglutinaron con portadores insolubles inmovilizadores de los anticuerpos anti-haptoglobina.

- 20 El método de confirmación se realizó de la misma manera que en la preparación de muestras y un método de inmunoaglutinación que se describirá a continuación, excepto que se utilizó 1,0 mg/ml de látex de poliestireno en el que se inmovilizó AO-53 (reconocimiento de cadena  $\alpha$ ) o AN12-8 (reconocimiento de cadena  $\beta$ ) como segundo reactivo y que se utilizaron muestras (que no contenían hemoglobina) obtenidas añadiendo haptoglobina libre a una solución de conservación (diluyente de calibrador de Hb "Eiken" (fabricado por Eiken Chemical Co., Ltd.)) para tener una  
25 concentración de 0 ng/ml o 24,5 pmol/ml. La concentración de haptoglobina de 24,5 pmol/ml corresponde a una concentración de adición de haptoglobina libre de 1,2 unidades/l.

- 30 Las partículas de látex de poliestireno inmovilizadoras de anticuerpos se prepararon mediante un método bien conocido. Es decir, se mezcló cada anticuerpo monoclonal anti-hemoglobina o anticuerpo monoclonal anti-haptoglobina con partículas de látex de poliestireno (diámetro de partícula promedio de 200 nm) y se inmovilizó en las superficies de las partículas de látex de poliestireno para preparar partículas de látex de poliestireno inmovilizadoras de anticuerpos.

- 35 [Tabla 6]

Anticuerpo	Concentración de látex (mg/ml) en el segundo reactivo					
	Ejemplo comparativo 8	Ejemplo 5-1	Ejemplo 5-2	Ejemplo 5-3	Ejemplo 5-4	Ejemplo 5-5
Anticuerpo anti-Hb	0,69	0,69	0,69	0,69	0,69	0,69
AO-53		0,08	0,15	0,23	0,31	
AN12-8						0,08

[Preparación de muestras]

- 40 Se recogieron dos muestras fecales (muestras fecales 1 y 2) de una persona sana. Se mezclaron cada una de las muestras fecales, la hemoglobina humana (Hbh) purificada a partir de sangre humana y la haptoglobina humana (Hph) [haptoglobina de fenotipo humano 1-1 (fabricada por SIGMA Corporation)] con una solución de conservación [diluyente calibrador de Hb "Eiken" (fabricado por Eiken Chemical Co., Ltd.)] para tener respectivamente una concentración fecal del 0,5 % (% en p/v) y las concentraciones indicadas en las Tablas 7 y 8 para preparar las muestras n.º 0 a 5. En la  
45 muestra n.º 3, se mezclan 0,6 unidades/l de haptoglobina humana con 600 µg/l de hemoglobina humana, y toda la hemoglobina y la haptoglobina forman complejos completos de hemoglobina y haptoglobina.

[Inmunoaglutinación]

- 50 Se añadieron respectivamente los reactivos de medición de los Ejemplos 5-1 a 5-5 y del Ejemplo comparativo 8 a las muestras n.º 0 a 5 de las muestras biológicas fecales 1 y 2, y se midió la turbidez utilizando un analizador clínico automatizado JCA-BM6070 para calcular los valores de conversión de la concentración de hemoglobina basándose en la curva de calibración que se ha creado de antemano. Por otra parte, también se calcularon los valores relativos (%) de hemoglobina con respecto a la muestra n.º 0 (muestra que no contiene haptoglobina humana). Los resultados se muestran en las Tablas 7 y 8.

- 55 Las condiciones de medición en JCA-BM6070 son las siguientes.

## ES 2 987 836 T3

Cantidad de muestra: 2,0  $\mu$ l  
Primer reactivo: 60  $\mu$ l  
Segundo reactivo: 30  $\mu$ l  
Longitud de onda de medición: 658 nm

[Tabla 7]  
Muestra biológica fecal 1

N.º	Hbh (µg/l)	Hph (unidades/l)	Resultados	Ejemplo comparativo 8	Ejemplo 5-1	Ejemplo 5-2	Ejemplo 5-3	Ejemplo 5-4	Ejemplo 5-5
0	600	0,0	Valor de conversión de la concentración de Hbh (µg/l)	568	560	563	566	563	570
1	600	0,2		546	552	559	561	557	565
2	600	0,4		524	548	555	556	551	567
3	600	0,6		437	545	564	570	560	562
4	600	0,7		414	541	557	563	560	557
5	600	0,8		401	538	556	565	558	555
0	600	0,0	Valor relativo de Hbh con respecto a la muestra n.º 0	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
1	600	0,2		96 %	99 %	99 %	99 %	99 %	99 %
2	600	0,4		92 %	98 %	99 %	98 %	98 %	100 %
3	600	0,6		77 %	97 %	100 %	101 %	99 %	99 %
4	600	0,7		73 %	96 %	99 %	99 %	99 %	98 %
5	600	0,8		71 %	96 %	99 %	100 %	99 %	97 %

[Tabla 8]  
Muestra biológica fecal 2

N.º	Hbh (µg/l)	Hph (unidades/l)	Resultados	Ejemplo comparativo 8	Ejemplo 5-1	Ejemplo 5-2	Ejemplo 5-3	Ejemplo 5-4	Ejemplo 5-5
0	600	0,0	Valor de conversión de la concentración de Hbh (µg/l)	567	560	564	562	568	571
1	600	0,2		550	556	562	566	564	572
2	600	0,4		528	551	559	557	554	572
3	600	0,6		430	540	559	559	556	560
4	600	0,7		405	536	554	555	554	556
5	600	0,8		380	515	545	550	547	546
0	600	0,0	Valor relativo de Hbh con respecto a la muestra n.º 0	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
1	600	0,2		97 %	99 %	100 %	101 %	99 %	100 %
2	600	0,4		93 %	98 %	99 %	99 %	97 %	100 %
3	600	0,6		76 %	96 %	99 %	99 %	98 %	98 %
4	600	0,7		71 %	96 %	98 %	99 %	98 %	97 %
5	600	0,8		67 %	92 %	97 %	98 %	96 %	96 %



## REIVINDICACIONES

1. Un reactivo para medir una cantidad total de hemoglobina, en donde la cantidad total de hemoglobina es la cantidad total de un complejo de hemoglobina y haptoglobina y una hemoglobina libre, que comprende:
  - 5 una partícula portadora insoluble inmovilizadora de un anticuerpo anti-hemoglobina; y
  - una partícula portadora insoluble inmovilizadora de un anticuerpo anti-haptoglobina.
2. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 1,
  - 10 en donde el reactivo es adecuado para medir una cantidad total de hemoglobina a través de un método de inmunoaglutinación.
3. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2,
  - en donde el número de tipos de anticuerpos anti-hemoglobina es de al menos dos y/o
  - 15 en donde el número de tipos de anticuerpos anti-haptoglobina es de uno.
4. El reactivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3,
  - en donde los portadores insolubles son partículas de látex y/o partículas de oro coloidal.
- 20 5. El reactivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4,
  - en donde el anticuerpo anti-hemoglobina y el anticuerpo anti-haptoglobina son anticuerpos monoclonales.
6. El reactivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,
  - 25 en donde la hemoglobina que se va a ensayar comprende un complejo de hemoglobina y haptoglobina seleccionado entre un complejo intermedio de hemoglobina y haptoglobina y un complejo completo de hemoglobina y haptoglobina, o la combinación de los mismos.
7. Un método para medir la hemoglobina en una muestra biológica, comprendiendo el método:
  - 30 una etapa de poner una muestra biológica en contacto con una partícula portadora insoluble inmovilizadora de un anticuerpo anti-hemoglobina y una partícula portadora insoluble inmovilizadora de un anticuerpo anti-haptoglobina para provocar inmunoaglutinación.
8. El método de medición de hemoglobina de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende:
  - 35 una etapa (1) de mezclar una muestra biológica con haptoglobina y formar un complejo de hemoglobina y haptoglobina para obtener una muestra que contenga el complejo de hemoglobina y haptoglobina; y
  - una etapa (2) de poner en contacto la muestra obtenida en la etapa (1) con el portador insoluble inmovilizador de un anticuerpo anti-hemoglobina y el portador insoluble inmovilizador de un anticuerpo anti-haptoglobina para provocar inmunoaglutinación.
- 40 9. El método de medición de acuerdo con la reivindicación 7 u 8,
  - en donde el número de tipos de anticuerpos anti-hemoglobina es de al menos dos y/o
  - en donde el número de tipos de anticuerpos anti-haptoglobina es de uno.
- 45 10. El método de medición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9,
  - en donde los portadores insolubles son partículas de látex y/o partículas de oro coloidal.
11. El método de medición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10,
  - 50 en donde el anticuerpo anti-hemoglobina y el anticuerpo anti-haptoglobina son anticuerpos monoclonales.
12. El método de medición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11,
  - en donde la muestra biológica es de heces, saliva u orina.
13. El método de medición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12,
  - 55 en donde la haptoglobina está contenida en una solución de conservación de muestras biológicas, preferentemente en donde una concentración de haptoglobina en la solución de conservación de muestras biológicas es de 0,05 unidades/l a 50 unidades/l.
14. El método de medición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13,
  - 60 en donde la hemoglobina de la muestra biológica contiene al menos una seleccionada del grupo que consiste en hemoglobina libre, un complejo intermedio de hemoglobina y haptoglobina y un complejo completo de hemoglobina y haptoglobina, y
  - en donde al menos una parte de la hemoglobina libre forma el complejo intermedio de hemoglobina y haptoglobina y/o el complejo completo de hemoglobina y haptoglobina junto con la haptoglobina después de la etapa (1).