

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 990 182**

51 Int. Cl.:

G01N 33/72 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.01.2020** **PCT/EP2020/051039**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2020** **WO20148394**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2020** **E 20700413 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024** **EP 3911959**

54 Título: **Flujo de trabajo de muestras a alta velocidad para medición de HbA1c basada en CL-EM**

30 Prioridad:

17.01.2019 EP 19152309

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

29.11.2024

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)

Grenzacherstraße 124

4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

KOBOLD, UWE;

LEINENBACH, ANDREAS y

MITRA, INDRANIL

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 990 182 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

Flujo de trabajo de muestras a alta velocidad para medición de HbA1c basada en CL-EM

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar fragmentos peptídicos de moléculas de glucohemoglobina A (HbA1c) mediante espectrometría de masas (EM).

Antecedentes de la invención

- 10 El control deficiente de los niveles circulantes de glucemia es un indicador de diabetes. La glucemia se puede unir en un procedimiento estadístico no enzimático a los residuos de lisina de los polipéptidos, dando lugar de este modo a glucopolipéptidos. En el caso de la hemoglobina A (HbA), se produce una reacción entre la glucosa y el extremo N de la cadena β . La cadena β de la glucohemoglobina A resultante se ha designado como HbA1c.
- 15 La HbA1c es la principal especie de glucohemoglobina en la sangre humana. El exhaustivo ensayo de control y complicaciones de la diabetes (DCCT) ha proporcionado pruebas de que complicaciones tales como la retinopatía, nefropatía y neuropatía están directamente relacionadas con el grado de hiperglucemia en pacientes con diabetes de tipo 1 (DM1) y ha mostrado que la medición de HbA1c en sangre es una excelente herramienta para la monitorización a largo plazo del estado glucémico de los pacientes diabéticos (Nathan *et al.*, N. Engl. J. Med 329 (1993) 977-986; Santiago, J.V., Diabetes 42 (1993) 1549-1554; Benjamin, J. y Sacks, D.B., Clin. Chem. 40 (1994) 683-687; y Goldstein D. *et al.*, Clin. Chem 40 (1994) 1637-1640). El estudio DCCT también ha demostrado claramente la necesidad de una medición fiable y reproducible de HbA1c y HbA0, la hemoglobina no glucada, respectivamente.
- 25 Existen numerosos procedimientos diferentes para determinar la glucohemoglobina, a saber procedimientos fisicoquímicos que incluyen cromatografía y/o espectrometría de masas (EM), procedimientos químicos y procedimientos inmunológicos. Un procedimiento de referencia para la medición de HbA1c en sangre humana que se ha aprobado por la Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio (IFCC) comprende la escisión enzimática de la hemoglobina en péptidos mediante la enzima endoproteinasa Glu-C
- 30 durante un periodo de tiempo de 18-20 h y, posteriormente, la separación y cuantificación de los hexapéptidos N terminales glucados y no glucados de la cadena β mediante HPLC y espectrometría de masas de ionización por electronebulización o en un enfoque bidimensional usando HPLC y electroforesis capilar con detección UV (Jeppsson *et al.*, Clin. Chem. Lab. Med. 40 (2002), 78-89).
- 35 Las modificaciones de este procedimiento de referencia se han descrito por Kaiser *et al.* (Clin. Chem. 54 (2008), 1018-1022; Li *et al.*, J. Chromatogr. B. 776 (2002), 149-160; Jeong (Mass Spectrom. Lett. 5 (2014), 52-56; y Zhang *et al.*, Clin. Chem. Lab Med. 54 (2016), 569-576), todos en referencia a una digestión proteolítica durante un periodo de tiempo de al menos 18 h.
- 40 Por tanto, los procedimientos conocidos que implican la digestión enzimática de la hemoglobina A requieren normalmente una incubación durante la noche para obtener una cantidad suficiente de productos de escisión y, por tanto, señales de medición estables. Además, se requiere una separación de mezclas complejas de péptidos que incluyen componentes de matriz con cromatografía convencional antes de someter la muestra a la detección por EM. Por tanto, estos procedimientos consumen mucho tiempo y son de uso limitado para mediciones de alto
- 45 rendimiento de muestras de pacientes.
- Por tanto, existe una necesidad de proporcionar un procedimiento rápido y fiable para determinar la HbA1c mediante EM.

50 Sumario de la invención

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la glucohemoglobina A (HbA1c) en una muestra, que comprende:

- 55 (a) proporcionar una muestra que comprende moléculas de hemoglobina A (HbA),
- (b) someter la muestra de la etapa (a) a una etapa de digestión proteolítica parcial en la que se generan fragmentos N terminales de moléculas de cadena β de hemoglobina A, y en la que se obtiene una mezcla que comprende moléculas de cadena β de HbA intactas y moléculas de cadena β de HbA digeridas proteolíticamente,
- 60 en el que, en la etapa de digestión proteolítica parcial (b), se digieren de un 1 % a un 20 % de las moléculas de cadena β de HbA presentes en la muestra en base a la cantidad total de moléculas de cadena β de HbA originalmente presentes en la muestra,
- 65 (c) opcionalmente enriquecer los fragmentos N terminales de moléculas de cadena β de hemoglobina A generados en la etapa (b), y

(d) someter la muestra que comprende fragmentos N terminales de moléculas de cadena β de hemoglobina A a un análisis por espectrometría de masas (EM) en el que se determina la cantidad o concentración de HbA1c en la muestra.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al uso de un kit, que comprende

(i) una enzima para la digestión proteolítica parcial de moléculas de cadena β de HbA y opcionalmente un tampón de digestión para dicha enzima,

(ii) un medio de parada, que puede detener una digestión proteolítica con la enzima de (i),

en el que la enzima (i) y el medio de parada (ii) se adaptan para proporcionar una mezcla que comprende moléculas de cadena β de HbA intactas y moléculas de cadena β de HbA digeridas proteolíticamente, en la que se digieren de un 1 % a un 20 % de las moléculas de cadena β de HbA en una muestra en base a la cantidad total de moléculas de cadena β de HbA originalmente presentes en la muestra, y

(iii) opcionalmente, medios de enriquecimiento para enriquecer las moléculas de HbA1c digeridas proteolíticamente, y

(iv) opcionalmente, un medio de elución que comprende un disolvente orgánico miscible en agua para su uso en la elución de componentes de muestra de los medios de enriquecimiento de (iii)

en un procedimiento de la invención.

Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso de un sistema de diagnóstico para realizar el procedimiento como se describe anteriormente. El sistema de diagnóstico se usa en particular conjuntamente con el kit como se describe anteriormente.

La presente invención permite la determinación rápida y fiable de moléculas de HbA1c glucadas digeridas proteolíticamente y, opcionalmente, moléculas de HbA0 no glucadas digeridas proteolíticamente en una muestra mediante EM.

Descripción detallada

Definiciones

La palabra "comprenden", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas indicados, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

Como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen también los respectivos términos en plural, a menos que el contenido lo indique claramente de otro modo.

Los porcentajes, concentraciones, cantidades y otros datos numéricos se pueden expresar o presentar en el presente documento en un formato de "intervalo". Se debe entender que dicho formato de intervalo se usa simplemente por conveniencia y brevedad y, por tanto, se debe interpretar de manera flexible para incluir no solo los valores numéricos explícitamente citados como los límites del intervalo, sino también para incluir todos los valores numéricos individuales o subintervalos englobados dentro de ese intervalo como si cada valor numérico y subintervalo se citara explícitamente. A modo de ilustración, se debe interpretar que un intervalo numérico de "de un 4 % a un 20 %" incluye no solo los valores explícitamente citados de un 4 % a un 20 %, sino que también incluye valores individuales y subintervalos dentro del intervalo indicado. Por tanto, en este intervalo numérico se incluyen valores individuales tales como 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ... 18, 19, 20 % y subintervalos tales como de 4-10 %, 5-15 %, 10-20 %, etc. Este mismo principio se aplica a los intervalos que citan valores mínimos o máximos. Además, dicha interpretación se debe aplicar con independencia de la amplitud del intervalo o de las características que se describen.

El término "aproximadamente", cuando se usa en conexión con un valor numérico, pretende englobar valores numéricos dentro de un intervalo que tiene un límite inferior que es un 5 % más pequeño que el valor numérico indicado y que tiene un límite superior que es un 5 % más grande que el valor numérico indicado.

El término "espectrometría de masas" ("espec. masas" o "EM") se refiere a una tecnología analítica usada para identificar compuestos por su masa. La EM es un procedimiento para filtrar, detectar y medir iones en base a su proporción entre masa y carga, o "m/z". La tecnología de EM incluye en general (1) ionización de compuestos para formar compuestos cargados; y (2) detección del peso molecular de los compuestos cargados y cálculo de

una proporción entre masa y carga. Los compuestos se pueden ionizar y detectar mediante cualquier medio adecuado. Un "espectrómetro de masas" incluye en general un ionizador y un detector de iones. En general, se ionizan una o más moléculas de interés y, posteriormente, se introducen los iones en un instrumento espectrográfico de masas donde, debido a una combinación de campos magnéticos y eléctricos, los iones siguen una trayectoria en el espacio que depende de la masa ("m") y la carga ("z"). El término "ionización" o "ionizar" se refiere al procedimiento de generar un ion de analito que tiene una carga eléctrica neta igual a una o más unidades de electrón. Los iones negativos son aquellos que tienen una carga neta negativa de una o más unidades de electrón, mientras que los iones positivos son aquellos que tienen una carga neta positiva de una o más unidades de electrón. El procedimiento de EM se puede realizar en "modo de iones negativos", en el que se generan y detectan iones negativos, o bien en "modo de iones positivos", en el que se generan y detectan iones positivos.

La "espectrometría de masas en tándem" o "EM/EM" implica múltiples etapas de selección y detección por espectrometría de masas, en la que la fragmentación del analito se produce entre las etapas. En un espectrómetro de masas en tándem, los iones se forman en la fuente de iones y se separan según la proporción entre masa y carga en la primera fase de la espectrometría de masas (EM1). Se seleccionan iones de una proporción entre masa y carga particular (iones precursores o iones originales) y se crean iones fragmentados (o iones derivados) mediante disociación inducida por colisión, reacción ion-molécula y/o fotodisociación. A continuación, los iones resultantes se separan y detectan en una segunda fase de espectrometría de masas (EM2).

La mayoría de los flujos de trabajo de muestras en EM incluyen además etapas de preparación y/o enriquecimiento de muestras, en las que, por ejemplo, el/los analito(s) de interés se separa(n) de la matriz, por ejemplo, constituyentes de la muestra diferentes del analito, usando, por ejemplo, cromatografía de gases o líquidos. Típicamente, para la medición por espectrometría de masas, se realizan las tres etapas siguientes:

(1) Se ioniza una muestra que comprende un analito de interés, normalmente mediante formación de aductos con cationes, a menudo mediante protonación a cationes. Las fuentes de ionización incluyen, pero no se limitan a, ionización por electronebulización (ESI) e ionización química a presión atmosférica (IQPA).

(2) Se clasifican y separan los iones de acuerdo con su masa y carga. La espectrometría de movilidad iónica de forma de onda asimétrica de alto campo (FAIMS) se puede usar como filtro de iones.

(3) Se detectan a continuación los iones separados, por ejemplo, en modo de reacción múltiple (MRM) y se muestran los resultados en un gráfico.

El término "ionización por electronebulización" o "ESI" se refiere a procedimientos en los que se hace pasar una solución a lo largo de una longitud reducida de un tubo capilar, hasta el extremo del que se aplica un alto potencial eléctrico positivo o negativo. Se vaporiza (nebuliza) una solución que llega al extremo del tubo en un chorro o pulverizador de gotitas muy pequeñas de solución en vapor de disolvente. Esta niebla de gotitas fluye a través de una cámara de evaporación, que se calienta ligeramente para evitar la condensación y para evaporar el disolvente. A medida que las gotitas se hacen más pequeñas, la densidad de carga eléctrica de superficie se incrementa hasta el momento en que la repulsión natural entre cargas similares provoca la liberación de iones, así como de moléculas neutras.

El término "ionización química a presión atmosférica" o "IQPA" se refiere a procedimientos de espectrometría de masas que son similares a ESI; sin embargo, la IQPA produce iones mediante reacciones ion-molécula que se producen dentro de un plasma a presión atmosférica. El plasma se mantiene mediante una descarga eléctrica entre el capilar pulverizador y un contraelectrodo. Los iones se extraen típicamente en el analizador de masas mediante el uso de un conjunto de fases de filtrado con separador de partículas sólidas (*skimmer*) mediante bombeo diferencial. Se puede usar un contraflujo de gas N₂ seco y precalentado para mejorar la eliminación del disolvente. La ionización en fase gaseosa en IQPA puede ser más eficaz que ESI para analizar entidades menos polares.

El "modo de reacción múltiple" o "MRM" es un modo de detección para un instrumento de EM en el que se detectan selectivamente un ion precursor y uno o más iones fragmentados.

Dado que un espectrómetro de masas separa y detecta iones de masas ligeramente diferentes, distingue fácilmente diferentes isótopos de un elemento determinado. Por tanto, la espectrometría de masas es un procedimiento importante para la determinación exacta de masas y la caracterización de analitos, incluyendo, pero sin limitarse a, analitos de bajo peso molecular, péptidos, polipéptidos o proteínas. Sus aplicaciones incluyen la identificación de proteínas y sus modificaciones postraduccionales, la elucidación de complejos proteicos, sus subunidades e interacciones funcionales, así como la medición global de proteínas en proteómica. La secuenciación *de novo* de péptidos o proteínas mediante espectrometría de masas se puede realizar típicamente sin conocimiento previo de la secuencia de aminoácidos.

La determinación espectrométrica de masas se puede combinar con procedimientos analíticos adicionales, incluyendo procedimientos cromatográficos tales como cromatografía de gases (CG), cromatografía de líquidos (CL), en particular HPLC, y/o técnicas de separación basadas en movilidad iónica.

En el contexto de la presente divulgación, los términos "analito", "molécula de analito" o "analito(s) de interés" se usan de manera intercambiable en referencia a las especies químicas que se van a analizar por medio de espectrometría de masas. Las especies químicas adecuadas que se van a analizar por medio de espectrometría de masas, es decir, analitos, pueden ser cualquier tipo de molécula presente en un organismo vivo, que incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARNm, miARN, ARNr, etc.), aminoácidos, péptidos, proteínas (por ejemplo, receptor de superficie celular, proteína citosólica, etc.), metabolitos u hormonas (por ejemplo, testosterona, estrógeno, estradiol, etc.), ácidos grasos, lípidos, carbohidratos, esteroides, oxoesteroides, secoesteroides (por ejemplo, vitamina D), moléculas características de una determinada modificación de otra molécula (por ejemplo, restos de glúcidos o residuos fosforilo en proteínas, residuos metilados en el ADN genómico) o una sustancia que se ha internalizado por el organismo (por ejemplo, fármacos terapéuticos, estupefacientes, toxinas, etc.) o un metabolito de dicha sustancia. Dicho analito puede servir como biomarcador. En el contexto de la presente invención, el término "biomarcador" se refiere a una sustancia dentro de un sistema biológico que se usa como indicador de un estado biológico de dicho sistema.

Los analitos pueden estar presentes en una muestra de interés, por ejemplo, una muestra biológica o clínica. Los términos "muestra" o "muestra de interés" se usan de manera intercambiable en el presente documento en referencia a una parte o pieza de un tejido, órgano o individuo, que típicamente es más pequeña que dicho tejido, órgano o individuo, y pretende representar la totalidad del tejido, órgano o individuo. Tras el análisis, una muestra proporciona información sobre el estado del tejido o el estado sano o enfermo de un órgano o individuo. Los ejemplos de muestras incluyen, pero no se limitan a, muestras líquidas, tales como sangre, suero, plasma, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva y líquido linfático, o muestras sólidas, tales como gotas de sangre seca y extractos tisulares. Otros ejemplos de muestras son cultivos celulares o cultivos tisulares.

En el contexto de la presente divulgación, la muestra puede derivar de un "individuo" o "sujeto". Típicamente, el sujeto es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domésticos (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas).

Antes de analizarse por medio de espectrometría de masas, una muestra se puede pretratar de una manera específica para la muestra y/o el analito. En el contexto de la presente divulgación, el término "pretratamiento" se refiere a cualquier medida requerida para permitir el análisis posterior de un analito deseado por medio de espectrometría de masas. Las medidas de pretratamiento incluyen típicamente, pero no se limitan a, la elución de muestras sólidas (por ejemplo, elución de gotas de sangre seca), la adición de un reactivo hemolizante (RH) a muestras de sangre completa y la adición de un reactivo enzimático a muestras de orina. También se considera como pretratamiento de la muestra la adición de patrones internos (PI).

El término "reactivo de hemólisis" (RH) se refiere a reactivos que lisan las células presentes en una muestra. En el contexto de la presente invención, reactivos de hemólisis se refiere en particular a reactivos que lisan las células presentes en una muestra de sangre, incluyendo, pero sin limitarse a, los eritrocitos presentes en muestras de sangre completa. Un reactivo de hemólisis bien conocido es el agua (H_2O), por ejemplo, agua desionizada o destilada. Otros ejemplos de reactivos de hemólisis incluyen, pero no se limitan a, líquidos con alta osmolaridad (por ejemplo, urea 8 M), líquidos iónicos y diferentes detergentes.

Típicamente, un patrón interno (PI) es una cantidad conocida de una sustancia que presenta propiedades similares a las del analito de interés cuando se somete al flujo de trabajo de detección espectrométrica de masas (es decir, incluyendo cualquier etapa de pretratamiento, enriquecimiento y detección real). Aunque el PI presenta propiedades similares a las del analito de interés, todavía es claramente distinguible del analito de interés. Por ejemplo, durante la separación cromatográfica, tal como cromatografía de gases o de líquidos, el PI tiene aproximadamente el mismo tiempo de retención que el analito de interés de la muestra. Por tanto, tanto el analito como el PI entran en el espectrómetro de masas al mismo tiempo. Sin embargo, el PI presenta una masa molecular diferente a la del analito de interés de la muestra. Esto permite una distinción espectrométrica de masas entre iones del PI e iones del analito por medio de sus diferentes proporciones masa/carga (m/z). Ambos se someten a fragmentación y proporcionan iones derivados. Estos iones derivados se pueden distinguir entre sí y de los respectivos iones originales por medio de sus proporciones m/z . En consecuencia, se puede realizar una determinación y cuantificación separadas de las señales del PI y del analito. Dado que el PI se ha añadido en cantidades conocidas, la intensidad de la señal del analito de la muestra se puede atribuir a una cantidad cuantitativa específica del analito. Por tanto, la adición de un PI permite una comparación relativa de la cantidad de analito detectado y posibilita la identificación y cuantificación inequívocas del/de los analito(s) de interés presente(s) en la muestra cuando el/los analito(s) llega(n) al espectrómetro de masas. Típicamente, pero no necesariamente, el PI es una variante marcada isotópicamente (que comprende, por ejemplo, al menos un marcador 2H , ^{13}C y/o ^{15}N , etc.) del analito de interés.

Además del pretratamiento, la muestra también se puede someter a una o más etapas de enriquecimiento, en las que la muestra se somete a uno o más "procedimientos de enriquecimiento" o "flujos de trabajo de enriquecimiento". Los procedimientos de enriquecimiento bien conocidos incluyen, pero no se limitan a, precipitación química, el uso de una fase sólida y procedimientos cromatográficos.

Precipitación química se refiere a la adición de componentes químicos a la muestra que provocan la participación de determinados constituyentes de la muestra. Por ejemplo, un procedimiento de precipitación bien conocido es la adición de acetonitrilo a la muestra.

Las fases sólidas incluyen, pero no se limitan a, cartuchos de extracción en fase sólida (EFS) y microesferas. El término "microesfera" se refiere a partículas esféricas no magnéticas, magnéticas o paramagnéticas. Las microesferas se pueden recubrir diferentemente para que sean específicas para un analito de interés. El recubrimiento puede diferir dependiendo del uso previsto, es decir, de la molécula de captura prevista. Es bien conocido para el experto en la técnica qué recubrimiento es adecuado para qué analito. Las microesferas pueden estar hechas de diversos materiales diferentes. Las microesferas pueden tener diversos tamaños y comprender una superficie con o sin poros.

El término "cromatografía" se refiere a un procedimiento en el que una mezcla química transportada por un líquido o gas se separa en componentes como resultado de la distribución diferencial de las entidades químicas a medida que fluyen alrededor de o sobre una fase líquida o sólida estacionaria.

El término "cromatografía de líquidos" o "CL" se refiere a un procedimiento de retardo selectivo de uno o más componentes de una solución fluida a medida que el fluido se filtra uniformemente a través de una columna de una sustancia finamente dividida o a través de rutas de paso capilares. El retardo resulta de la distribución de los componentes de la mezcla entre una o más fases estacionarias y el fluido a granel (es decir, la fase móvil), a medida que este fluido se mueve con respecto a la(s) fase(s) estacionaria(s). Los procedimientos en los que la fase estacionaria es más polar que la fase móvil (por ejemplo, tolueno como fase móvil, sílice como fase estacionaria) se denominan cromatografía de líquidos en fase normal (NPLC) y los procedimientos en los que la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil (por ejemplo, mezcla de agua y metanol como fase móvil y C18 (octadecilsililo) como fase estacionaria) se denominan cromatografía de líquidos en fase inversa (RPLC).

"Cromatografía de líquidos de alto rendimiento" o "HPLC" se refiere a un procedimiento de cromatografía de líquidos en el que el grado de separación se incrementa forzando la fase móvil bajo presión a través de una fase estacionaria, típicamente una columna densamente rellena. Típicamente, la columna se rellena con una fase estacionaria compuesta por partículas de conformación irregular o esférica, una capa monolítica porosa o una membrana porosa. Históricamente, la HPLC se divide en dos subclases diferentes en base a las polaridades de las fases móvil y estacionaria, a saber, NP-HPLC y RP-HPLC.

Micro-CL se refiere a un procedimiento de HPLC que usa una columna que tiene un diámetro interno de columna estrecho, típicamente inferior a 1 mm, por ejemplo, aproximadamente 0,5 mm. "Cromatografía de líquidos de ultraalto rendimiento" o "UHPLC" se refiere a un procedimiento de HPLC que usa una alta presión de, por ejemplo, 120 MPa (17.405 lbf/in²), o aproximadamente 1200 atmósferas.

CL rápida se refiere a un procedimiento de CL que usa una columna que tiene un diámetro interno como se menciona anteriormente, con una longitud corta <2 cm, por ejemplo, 1 cm, aplicando un caudal como se menciona anteriormente y con una presión como se menciona anteriormente (micro-CL, UHPLC). El protocolo corto de CL rápida incluye una etapa de captura/lavado/elución usando una única columna analítica y realiza la CL en un tiempo muy corto <1 min.

Otros modos de CL bien conocidos incluyen cromatografía de interacción hidrófila (CIH), CL de exclusión por tamaño, CL de intercambio iónico y CL de afinidad.

La separación por CL puede ser CL unicanal o CL multicanal que comprende una pluralidad de canales de CL dispuestos en paralelo. En CL, los analitos se pueden separar de acuerdo con su polaridad o valor de log P, tamaño o afinidad, como conoce en general el experto en la técnica.

En el contexto de la presente divulgación, el término "primer procedimiento de enriquecimiento", "primera etapa de enriquecimiento" o "primer flujo de trabajo de enriquecimiento" se refiere a un procedimiento de enriquecimiento que se produce posteriormente al pretratamiento de la muestra y proporciona una muestra que comprende un analito enriquecido con respecto a la muestra inicial.

En el contexto de la presente divulgación, el término "segundo procedimiento de enriquecimiento", "segunda etapa de enriquecimiento" o "segundo flujo de trabajo de enriquecimiento" se refiere a un procedimiento de enriquecimiento que se produce posteriormente al pretratamiento y al primer procedimiento de enriquecimiento de la muestra y proporciona una muestra que comprende un analito enriquecido con respecto a la muestra inicial y a la muestra después del primer procedimiento de enriquecimiento.

El término "cromatografía" se refiere a un procedimiento en el que una mezcla química transportada por un líquido o gas se separa en componentes como resultado de la distribución diferencial de las entidades químicas a medida que fluyen alrededor de o sobre una fase líquida o sólida estacionaria.

Un "kit" es cualquier artículo de fabricación (por ejemplo, un envase o recipiente) que comprende al menos un reactivo, por ejemplo, un medicamento para el tratamiento de un trastorno, o una sonda para detectar específicamente un analito de la presente invención. El kit se promociona, distribuye o vende preferentemente como una unidad para realizar el procedimiento de la presente invención. Típicamente, un kit puede comprender además medios de vehículo que se compartimentan para recibir en aislamiento hermético uno o más medios de recipiente, tales como viales, tubos y similares. En particular, un medio de recipiente puede comprender uno de los elementos separados que se van a usar en el procedimiento del primer aspecto. Los kits pueden comprender además uno o más de otros recipientes que comprenden otros materiales incluyendo, pero sin limitarse a, tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos del envase con instrucciones de uso. Puede estar presente una etiqueta en el recipiente para indicar que la composición se usa para una aplicación específica, y también puede indicar las directrices para su uso *in vivo* o *in vitro*. El kit también puede incluir un código de programa informático proporcionado en un medio o dispositivo de almacenamiento de datos, tal como un medio de almacenamiento óptico (por ejemplo, un disco compacto) o directamente en un ordenador o dispositivo de procesamiento de datos. Además, el kit puede comprender cantidades estándar para los biomarcadores como se describe en otra parte en el presente documento para propósitos de calibración.

Un "prospecto del envase" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de los productos de diagnóstico que contienen información sobre las indicaciones, uso, rendimiento y/o advertencias que se refieren al uso de dicho producto de diagnóstico.

Modos de realización

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la glucohemoglobina A (HbA1c) en una muestra, que comprende:

(a) proporcionar una muestra que comprende moléculas de hemoglobina A (HbA),

(b) someter la muestra de la etapa (a) a una etapa de digestión proteolítica parcial en la que se generan fragmentos N terminales de moléculas de cadena β de hemoglobina A, y en la que se obtiene una mezcla que comprende moléculas de cadena β de HbA intactas y moléculas de cadena β de HbA digeridas proteolíticamente,

en el que, en la etapa de digestión proteolítica parcial (b), se digieren de un 1 % a un 20 % de las moléculas de cadena β de HbA presentes en la muestra en base a la cantidad total de moléculas de cadena β de HbA originalmente presentes en la muestra

(c) opcionalmente enriquecer los fragmentos N terminales de moléculas de cadena β de hemoglobina A generados en la etapa (b), y

(d) someter la muestra que comprende fragmentos N terminales de moléculas de cadena β de hemoglobina A a un análisis por espectrometría de masas (EM) en el que se determina la cantidad o concentración de HbA1c en la muestra.

De este modo, se puede determinar la cantidad o concentración de HbA1c, en particular la cantidad relativa de HbA1c, es decir, la proporción de moléculas de HbA1c glucadas con respecto a moléculas de HbA0 no glucadas o con respecto a moléculas de HbA en total, en una muestra. El procedimiento es altamente exacto y proporciona un coeficiente de variación (CV) de un 2,5 % o menos, en particular de un 2,0 % o menos, más en particular de un 1,5 % o menos, cuando se determina repetidamente la cantidad de HbA1c, la proporción de HbA1c/HbA o la proporción HbA1c/HbA0 en una muestra determinada.

De acuerdo con la etapa (a), se proporciona una muestra que comprende moléculas de hemoglobina. La muestra es, preferentemente, una muestra de sangre completa hemolizada, en particular una muestra de sangre completa humana hemolizada, por ejemplo, derivada de un sujeto del que se va a someter la prueba la sangre para determinar la cantidad de glucohemoglobina A. La hemólisis se lleva a cabo en particular mediante dilución con agua (H₂O), por ejemplo, agua desionizada o destilada, en particular en una proporción de muestra:agua de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:20, en particular de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:10, en particular de aproximadamente 1:9 (v/v). La muestra se puede hemolizar durante un tiempo de menos de aproximadamente 30 min, de menos de aproximadamente 10 min, de menos de aproximadamente 5 min o incluso de menos de aproximadamente 2 min. En modos de realización particulares, la muestra se hemoliza durante un tiempo de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 s.

En modos de realización particulares, la hemólisis se lleva a cabo mezclando la muestra y el agua, en particular

agitando en vórtex la muestra y el agua. En particular, la muestra y el agua se mezclan, en particular se agitan en vórtex, durante de aproximadamente 1 a aproximadamente 60 s, en particular durante de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 s, en particular durante aproximadamente 10 s.

- 5 Durante la hemólisis, la muestra se puede mantener a una temperatura de 20 °C a 30 °C, en particular a 22-25 °C, en particular a temperatura ambiente.

En modos de realización particulares, la hemólisis de la muestra se lleva a cabo mezclando la muestra con agua en una proporción 1:9 mediante agitación en vórtex durante 10 s a temperatura ambiente.

- 10 La etapa (b) del procedimiento de la invención comprende una digestión proteolítica parcial de las moléculas de HbA en la muestra. Sorprendentemente, se encontró que, cuando se someten las moléculas de hemoglobina A presentes en una muestra a una digestión proteolítica parcial, la cantidad de productos de digestión es suficiente para permitir una determinación exacta de HbA1c en la muestra. Por tanto, se proporciona un procedimiento
- 15 rápido y fiable para la determinación de HbA1c. La digestión proteolítica parcial da como resultado una mezcla que comprende moléculas de HbA intactas y moléculas de HbA digeridas proteolíticamente, en particular una mezcla de moléculas de cadena β de HbA1c intactas, moléculas de cadena β de HbA0 intactas, moléculas de cadena β de HbA1c digeridas proteolíticamente y moléculas de cadena β de HbA0 digeridas proteolíticamente. La digestión proteolítica parcial en la etapa (b) comprende una digestión en la que se digieren de
- 20 aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 20 %, en particular aproximadamente de un 5 % a un 10 % de las moléculas de cadena β de HbA presentes en la muestra en base a la cantidad total de moléculas de cadena β de HbA originalmente presentes en la muestra.

- 25 La digestión proteolítica parcial en la etapa (b) del procedimiento de la invención se lleva a cabo con una enzima proteolítica en condiciones en las que tiene lugar la escisión proteolítica de las moléculas de cadena β de HbA. Preferentemente, se selecciona una enzima proteolítica que, en base a su especificidad de escisión, genera un fragmento N terminal de la molécula de cadena β de hemoglobina A que tiene una longitud en el intervalo de 4 a 20 aminoácidos, en particular en el intervalo de 5 a 15 aminoácidos. Más preferentemente, la enzima proteolítica escinde el extremo N de la molécula de cadena β de HbA humana como se muestra en la SEQ ID NO: 1 después
- 30 de la posición aminoacídica 6, 8 o 14.

- En modos de realización particulares, la digestión proteolítica parcial en la etapa (b) se lleva a cabo usando una endopeptidasa, en particular una endopeptidasa seleccionada del grupo que consiste en Glu-C, tripsina, pepsina y termolisina. La digestión proteolítica con Glu-C da como resultado un fragmento N terminal de 6 aminoácidos,
- 35 la digestión proteolítica con tripsina da como resultado un fragmento N terminal de 8 aminoácidos y la digestión proteolítica con pepsina da como resultado un fragmento N terminal de 14 aminoácidos. En un modo de realización particular, la digestión proteolítica se lleva a cabo con la endopeptidasa Glu-C.

- 40 En modos de realización particulares de la presente invención, la digestión proteolítica parcial en la etapa (b) se lleva a cabo durante un periodo de aproximadamente 10 min a aproximadamente 120 min, por ejemplo, durante un periodo de tiempo de aproximadamente 60 min o menos, aproximadamente 45 min o menos o aproximadamente 30 min o menos. En modos de realización particulares, la digestión proteolítica parcial se lleva a cabo durante de aproximadamente 15 min a aproximadamente 45 min.

- 45 En modos de realización particulares, la digestión proteolítica parcial en la etapa (b) se lleva a cabo a un intervalo de temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 40 °C, en particular de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 37 °C, en particular de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 37 °C. En modos de realización particulares, la digestión proteolítica parcial se lleva a cabo a 37 °C.

- 50 En modos de realización, el tampón usado para la digestión proteolítica parcial en la etapa (b) es un tampón que no comprende iones Na^+ y/o K^+ , en particular un tampón que comprende iones amonio tal como un tampón de acetato de amonio o citrato de amonio, por ejemplo, que comprende acetato de amonio de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM, o acetato de amonio aproximadamente 30 mM.

- 55 En modos de realización, el pH del tampón de digestión dependerá de la enzima proteolítica específica. En modos de realización en los que se usa Glu-C como enzima proteolítica, el tampón de digestión tiene un pH ácido, por ejemplo, un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 5, en particular un pH de aproximadamente 4,2 a aproximadamente 4,5, o un pH de aproximadamente 4,3.

- 60 En modos de realización, la proteasa en la etapa (b) está presente en cualquier concentración adecuada para obtener el grado deseado de digestión parcial. En modos de realización, la enzima proteolítica, por ejemplo, la endopeptidasa Glu-C tiene una concentración de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 mg/ml, en particular de 0,3 mg/ml a 0,8 mg/ml, en particular de aproximadamente 0,6 mg/ml. En modos de realización particulares en los que se usa Glu-C como enzima proteolítica, la concentración usada en la digestión proteolítica
- 65 parcial en la etapa (b) es de aproximadamente 0,6 mg/ml.

En modos de realización particulares, la digestión proteolítica parcial en la etapa (b) se lleva a cabo usando la endopeptidasa Glu-C durante aproximadamente 45 min a una temperatura de aproximadamente 37 °C.

5 En modos de realización particulares, la digestión proteolítica parcial en la etapa (b) se lleva a cabo usando la endopeptidasa Glu-C a una concentración de aproximadamente 0,6 mg/ml durante aproximadamente 45 min a una temperatura de aproximadamente 37 °C.

10 En modos de realización particulares, la digestión proteolítica parcial en la etapa (b) se lleva a cabo usando la endopeptidasa Glu-C a una concentración de aproximadamente 0,6 mg/ml en tampón de acetato de amonio 30 mM, durante aproximadamente 45 min a una temperatura de aproximadamente 37 °C.

15 En modos de realización particulares, la digestión proteolítica parcial en la etapa (b) se lleva a cabo usando la endopeptidasa Glu-C a una concentración de 0,6 mg/ml en tampón de acetato de amonio 30 mM a un pH de aproximadamente 4,3, durante aproximadamente 45 min a una temperatura de aproximadamente 37 °C.

20 En modos de realización particulares de la invención, la digestión proteolítica parcial en la etapa (b) se detiene después de haber logrado el grado deseado de escisión proteolítica. Por ejemplo, la digestión se puede detener añadiendo un medio de parada que pueda detener o detenga la digestión proteolítica. En modos de realización particulares, el agente de parada es un medio de dilución, por ejemplo, una solución ácida, en particular una solución ácida que comprende ácido fórmico (FA). En modos de realización, dicha solución ácida comprende FA en agua. En modos de realización en los que se usa FA en la solución ácida para detener la digestión proteolítica parcial en la etapa (b), el FA puede estar presente a una concentración de un 0,05 % a un 0,2 % (v/v) de FA, en particular a una concentración de aproximadamente un 0,1 % (v/v) de FA. En modos de realización, el ácido, en particular el FA, ajusta el pH a de aproximadamente 1 a aproximadamente 4. En particular, el pH se ajusta a aproximadamente 2,7.

30 En modos de realización particulares, la digestión proteolítica parcial en la etapa (b) se lleva a cabo usando la endopeptidasa Glu-C a una concentración de aproximadamente 0,6 mg/ml en tampón de acetato de amonio aproximadamente 30 mM a un pH de aproximadamente 4,3, durante aproximadamente 45 min a una temperatura de aproximadamente 37 °C, y se detiene después de usar un tampón de dilución que comprende aproximadamente un 0,1 % (v/v) de FA en agua para ajustar un pH a aproximadamente 2,7.

35 En modos de realización particulares, la muestra obtenida después de la digestión proteolítica parcial de la etapa (b) se puede someter además a un flujo de trabajo de enriquecimiento de analitos, es decir, la etapa de enriquecimiento (c) que comprende enriquecer fragmentos N terminales generados proteolíticamente de la cadena β de hemoglobina A en la muestra. El término "enriquecer" fragmentos N terminales generados proteolíticamente se entiende como incrementar la cantidad relativa de moléculas de fragmentos N terminales frente a otros constituyentes de muestra antes de someter la muestra a análisis por EM. En particular, la etapa de enriquecimiento comprende un enriquecimiento de fragmentos de cadena β de hemoglobina A N terminales mientras que se disminuyen o eliminan otros constituyentes de muestra que potencialmente interfieren con la medición. En modos de realización particulares, los fragmentos de cadena β de hemoglobina A N terminales se enriquecen en al menos un factor de aproximadamente 2, en al menos un factor de aproximadamente 5 o en al menos un factor de aproximadamente 10.

45 La etapa de enriquecimiento (c) puede incluir uno o más procedimientos de enriquecimiento, en particular una primera y/o una segunda etapa de enriquecimiento. Los procedimientos de enriquecimiento son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, procedimientos de enriquecimiento químicos que incluyen, pero no se limitan a, precipitación química, y procedimientos de enriquecimiento que usan fases sólidas, incluyendo, pero sin limitarse a, procedimientos de extracción en fase sólida, flujos de trabajo con microesferas y procedimientos cromatográficos (por ejemplo, cromatografía de gases o de líquidos). En consecuencia, en modos de realización particulares, la etapa de enriquecimiento (c) comprende uno o más procedimientos de enriquecimiento seleccionados del grupo que consiste en precipitación química, procedimientos que usan procedimientos de extracción en fase sólida, flujos de trabajo con microesferas y procedimientos cromatográficos.

55 En modos de realización, la etapa de enriquecimiento (c) comprende uno o dos procedimientos de enriquecimiento, es decir, comprende la etapa de enriquecimiento (c)(i) y/o la etapa de enriquecimiento (c)(ii). En modos de realización en los que el procedimiento comprende la etapa de enriquecimiento (c)(i) y la etapa de enriquecimiento (c)(ii), la etapa de enriquecimiento (c)(i) se realiza antes de la etapa de enriquecimiento (c)(ii).

60 En modos de realización, una primera etapa de enriquecimiento (c)(i) comprende una etapa de separación de unidos/libres que comprende la adición de una fase sólida que transporta grupos selectivos de analito a la muestra pretratada. La fase sólida puede estar compuesta de partículas sólidas o de una fase sólida no particulada, por ejemplo, una superficie recubierta dentro de un recipiente o un pocillo. En modos de realización particulares, la fase sólida está compuesta de partículas magnéticas o paramagnéticas, en particular partículas que tienen un núcleo magnético o paramagnético. En modos de realización, dicho núcleo magnético o paramagnético comprende un óxido metálico y/o un carburo metálico. En un modo de realización especialmente

particular, el núcleo comprende Fe_3O_4 .

La superficie de la fase sólida, en particular las microesferas magnéticas o paramagnéticas, puede ser una superficie hidrófoba, en particular que comprende grupos orgánicos hidrófobos tales como grupos alquilo C_3 - C_{18} , más en particular grupos alquilo C_4 . Además, la superficie hidrófoba de la fase sólida, en particular la superficie de las microesferas magnéticas o superparamagnéticas, comprende poros. El tamaño de poro puede estar en el intervalo de 1 nm a 200 nm, en particular de menos de aproximadamente 100 nm, en particular de menos de aproximadamente 10 nm. Las superficies hidrófobas adecuadas se pueden encontrar, por ejemplo, en "The HPLC Expert: Possibilities and Limitations of Modern High Performance Liquid Chromatography" DOI: 10.1002/9783527677610

En modos de realización, la etapa de enriquecimiento (c) comprende una primera etapa de enriquecimiento (c)(i) que usa microesferas magnéticas o paramagnéticas. En modos de realización, una primera etapa de enriquecimiento (c)(i) comprende la adición de microesferas magnéticas o paramagnéticas que transportan grupos para la unión selectiva de fragmentos N terminales generados proteolíticamente de moléculas de cadena β de hemoglobina A presentes en la muestra. En modos de realización, la adición de las microesferas magnéticas comprende agitación o mezclado. Sigue un periodo de incubación predefinido para capturar los fragmentos N terminales generados proteolíticamente de moléculas de cadena β de hemoglobina A en la microesfera. En modos de realización, el flujo de trabajo comprende una etapa de lavado (L1) después de la incubación con las microesferas magnéticas. Dependiendo del/de los analito(s), se realizan una o más etapas de lavado (L2) adicionales. Una etapa de lavado (L1, L2) comprende una serie de etapas que incluyen separación de microesferas magnéticas por una unidad de manipulación de microesferas magnéticas que comprende imanes o electroimanes, aspiración de líquido, adición de un tampón de lavado, resuspensión de las microesferas magnéticas, otra etapa de separación de microesferas magnéticas y otra aspiración del líquido. Además, las etapas de lavado pueden diferir en términos de tipo de disolvente (agua/orgánico/sal/pH), además del volumen y el número o la combinación de ciclos de lavado. Es bien conocido para el experto en la técnica cómo elegir los parámetros respectivos. La última de las etapas de lavado (L1, L2) va seguida de la adición de un reactivo de elución, seguida de la resuspensión de las microesferas magnéticas y un periodo de incubación predefinido para liberar el/los analito(s) de interés de las microesferas magnéticas. A continuación, se separan las microesferas magnéticas libres y unidas y se captura el sobrenadante que contiene los fragmentos de cadena β de hemoglobina A N terminales.

En modos de realización, la puesta en contacto de la muestra que comprende fragmentos de cadena β de hemoglobina A N terminales con la fase sólida tiene lugar preferentemente a un pH ácido, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 1 a aproximadamente 4, en particular a un pH de aproximadamente 2,7. Para este propósito, se puede diluir una muestra, por ejemplo, una muestra de sangre completa hemolizada, después de una digestión proteolítica parcial con un medio ácido, por ejemplo, ácido fórmico como se describe anteriormente a una concentración de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 0,2 % (v/v), por ejemplo, aproximadamente un 0,1 % (v/v), para obtener el pH deseado.

La elución selectiva de fragmentos N terminales generados proteolíticamente unidos de moléculas de cadena β de hemoglobina A de la fase sólida se puede realizar poniendo en contacto la fase sólida cargada con un medio de elución, que puede ser una solución acuosa que comprende un disolvente orgánico miscible en agua, en particular acetonitrilo, o metanol, en una cantidad de aproximadamente un 5 a aproximadamente un 20 % (v/v), por ejemplo, aproximadamente un 10 % (v/v). El medio de elución es preferentemente un medio ácido, en particular que comprende ácido fórmico. La porción acuosa del medio de elución puede ser sustancialmente la misma que la descrita para el medio de unión en fase sólida, por ejemplo, un medio ácido que tiene un pH de aproximadamente 1 a aproximadamente 4, por ejemplo, un pH de aproximadamente 2,7.

De forma alternativa o adicionalmente, la etapa de enriquecimiento (c) puede comprender una segunda etapa de enriquecimiento (c)(ii). En la segunda etapa de enriquecimiento (c)(ii), se enriquecen adicionalmente fragmentos de cadena β de hemoglobina A N terminales en la muestra. En modos de realización particulares, la etapa de enriquecimiento (c)(ii) comprende una etapa cromatográfica en la que se separan los constituyentes individuales de la muestra entre sí. En modos de realización, la segunda etapa de enriquecimiento (c)(ii) se puede realizar posteriormente a la digestión proteolítica parcial de la etapa (b) como se describe en detalle anteriormente, o se puede realizar posteriormente a la primera etapa de enriquecimiento (c)(i) como se describe en detalle anteriormente.

En la segunda etapa de enriquecimiento (c)(ii) se usa la separación cromatográfica para enriquecer adicionalmente el analito de interés en la muestra. En modos de realización, la separación cromatográfica es cromatografía de gases o de líquidos. Ambos procedimientos son bien conocidos por el experto en la técnica. En modos de realización, la cromatografía de líquidos se selecciona del grupo que consiste en HPLC, CL rápida, micro-CL, inyección de flujo y trampa y elución. En modos de realización particulares, la separación cromatográfica comprende el uso de una única columna cromática o el uso de dos o más columnas cromáticas. En modos de realización particulares en los que se usan dos o más columnas cromáticas, las columnas se sitúan corriente abajo una de otra, es decir, una segunda columna se sitúa corriente abajo de una primera columna, y

una tercera columna opcional se sitúa corriente abajo de la segunda columna, etc. En modos de realización en los que se usan dos o más columnas, estas columnas pueden ser idénticas o pueden diferir entre si dependiendo de la función deseada. Es bien conocido para el experto en la técnica elegir las columnas y la configuración correctas.

En modos de realización, la muestra obtenida después de la etapa de digestión proteolítica (b) o la primera etapa de enriquecimiento (c)(i) se transfiere a una estación de CL o se transfiere a la estación de CL después de una etapa de dilución mediante adición de un líquido de dilución. También se pueden usar diferentes procedimientos/reactivos de elución, cambiando, por ejemplo, el tipo de disolventes (agua/orgánico/sal/pH) y el volumen. Los diversos parámetros son bien conocidos para el experto en la técnica y se eligen fácilmente.

En modos de realización particulares, la etapa de enriquecimiento (c) comprende una primera etapa de enriquecimiento (c)(i) y una segunda etapa de enriquecimiento (c)(ii), en particular en la que la segunda etapa de enriquecimiento (c)(ii) se realiza posteriormente a la primera etapa de enriquecimiento (c)(i). En modos de realización particulares, la primera etapa de enriquecimiento (c)(i) comprende un flujo de trabajo con microesferas como se describe en detalle anteriormente, y la segunda etapa de enriquecimiento (c)(ii) comprende cromatografía de líquidos, en particular seleccionada del grupo que consiste en HPLC, CL rápida, micro-CL, inyección de flujo y/o trampa y elución.

De acuerdo con la presente invención, la etapa (d) del procedimiento de la presente invención comprende un análisis de fragmentos N terminales de moléculas de cadena β de hemoglobina A que se han generado mediante digestión parcial con una proteasa tal como pepsina, tripsina o Glu-C, y que se han separado de las moléculas de cadena β de hemoglobina A intactas no digeridas antes del análisis por EM.

El análisis de acuerdo con la etapa (d) se lleva a cabo por EM. Preferentemente, el procedimiento de análisis por EM comprende un análisis por EM en tándem (EM/EM), en particular un análisis por EM/EM de triple cuadrupolo (Q).

En modos de realización, la etapa (d) de análisis espectrométrico de masas comprende:

(i) someter un ion de los fragmentos N terminales generados proteolíticamente de moléculas de cadena β de hemoglobina A a una primera fase de análisis espectrométrico de masas, con lo que el ion original de los fragmentos N terminales generados proteolíticamente de moléculas de cadena β de hemoglobina A se caracteriza de acuerdo con su proporción masa/carga (m/z),

(ii) provocar la fragmentación del ion original, en la que el ion derivado de los fragmentos N terminales generados proteolíticamente de moléculas de cadena β de hemoglobina A difiere en su proporción m/z de la del ion original de los fragmentos N terminales generados proteolíticamente de moléculas de cadena β de hemoglobina A, y

(iii) someter el ion derivado a una segunda fase de análisis espectrométrico de masas, con lo que el ion derivado se caracteriza de acuerdo con su proporción m/z .

El procedimiento de la invención comprende una determinación cuantitativa de HbA1c en la muestra. En particular, se determina la cantidad relativa de moléculas de HbA1c glucadas con respecto a moléculas de HbA0 no glucadas o con respecto a moléculas de HbA en total. En un modo de realización especialmente preferente, esta cantidad relativa se determina con un coeficiente de variación (CV) de un 2,5 % o menos, en particular de un 2,0 % o menos, más en particular de un 1,5 % o menos.

En un modo de realización especialmente preferente, el procedimiento de la invención comprende un flujo de trabajo como sigue:

(a) hemolizar una muestra de sangre completa, por ejemplo, mediante dilución con H_2O ,

(b) someter la muestra de la etapa (a) a una digestión proteolítica parcial con la endoproteinasa Glu-C, en la que se generan fragmentos N terminales de moléculas de cadena β de hemoglobina A y detener la digestión añadiendo ácido diluido, por ejemplo, ácido fórmico,

(c) enriquecer los fragmentos N terminales de moléculas de cadena β de hemoglobina A generados en la etapa (b) poniendo en contacto la muestra con una fase sólida, en particular compuesta por partículas magnéticas o paramagnéticas, en particular que tienen una superficie modificada hidrofóbicamente, en condiciones en las que los fragmentos N terminales generados proteolíticamente de moléculas de cadena β de hemoglobina A se unen a la fase sólida y eluyendo selectivamente los fragmentos unidos de la fase sólida cargada, y

(d) someter la muestra de la etapa (c) que comprende fragmentos N terminales de moléculas de cadena β de hemoglobina A a un análisis por EM, en particular espectrometría de masas en tándem (EM/EM), en particular

EM en tándem de triple cuadrupolo, en la que se determina la cantidad o concentración de HbA1c en la muestra.

En otros modos de realización del primer aspecto, el procedimiento para determinar la glucohemoglobina A (HbA1c) en una muestra comprende la etapa adicional de añadir un patrón interno (PI) a la muestra. En modos de realización, el patrón interno se añade a la muestra antes o después de la etapa de digestión proteolítica parcial (b). En caso de que el patrón interno se añada antes de la etapa de digestión proteolítica parcial (b), el patrón interno es preferentemente una molécula de hemoglobina intacta marcada isotópicamente. En caso de que el patrón interno se añada después de la etapa de digestión proteolítica parcial (b), el patrón interno es preferentemente un péptido de HbA1c marcado isotópicamente. En modos de realización, el PI marcado isotópicamente comprende al menos un marcador ^2H , ^{13}C y/o ^{15}N .

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al uso de un kit para realizar el procedimiento como se describe anteriormente, comprendiendo el kit

(i) una enzima para la digestión proteolítica parcial de moléculas de cadena β de HbA y opcionalmente un tampón de digestión para dicha enzima,

(ii) un medio de parada, que puede detener o detiene una digestión proteolítica con la enzima de (i), y

en el que la enzima (i) y el medio de parada (ii) se adaptan para proporcionar una mezcla que comprende moléculas de cadena β de HbA intactas y moléculas de cadena β de HbA digeridas proteolíticamente, en la que se digieren de un 1 % a un 20 % de las moléculas de cadena β de HbA en una muestra en base a la cantidad total de moléculas de cadena β de HbA originalmente presentes en la muestra,

(iii) opcionalmente, medios de enriquecimiento para enriquecer las moléculas de HbA1c digeridas proteolíticamente, y

(iv) opcionalmente, un medio de elución que comprende un disolvente orgánico miscible en agua para su uso en la elución de componentes de muestra de los medios de enriquecimiento de (iii).

Con respecto a modos de realización particulares del segundo aspecto de la presente invención, se hace referencia a todos los modos de realización descritos anteriormente en detalle en el contexto del primer aspecto.

En modos de realización del segundo aspecto de la presente invención, la enzima comprendida en el kit se selecciona del grupo que consiste en Glu-C, tripsina y pepsina. En modos de realización particulares, la enzima comprendida es Glu-C.

En modos de realización del segundo aspecto, la enzima, en particular Glu-C, está comprendida en un tampón que no comprende iones Na^+ y/o K^+ , en particular en un tampón que comprende iones amonio tal como un tampón de acetato de amonio o citrato de amonio. En modos de realización particulares, Glu-C está comprendida en un tampón que comprende acetato de amonio de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM, o acetato de amonio aproximadamente 30 mM.

En modos de realización, el pH del tampón de digestión dependerá de la enzima proteolítica específica. En modos de realización en los que Glu-C está comprendida en el kit, el tampón de digestión tiene un pH ácido, en particular, un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 5, en particular un pH de aproximadamente 4,2 a aproximadamente 4,5, en particular un pH de aproximadamente 4,3.

En modos de realización, la enzima, en particular Glu-C, está presente en cualquier concentración adecuada para obtener el grado deseado de digestión proteolítica parcial. En modos de realización, la enzima proteolítica, en particular Glu-C, comprendida en el kit tiene una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/ml, en particular de 2 mg/ml a 3 mg/ml, en particular de aproximadamente 2 mg/ml. En modos de realización particulares en los que se usa Glu-C como enzima proteolítica, la concentración comprendida en el kit es de aproximadamente 2 mg/ml.

En modos de realización, el kit comprende además un medio de parada, por ejemplo, un medio de dilución, que puede detener o detiene la digestión proteolítica. En modos de realización, el medio de dilución es una solución ácida que comprende ácido fórmico (FA). En modos de realización, dicha solución ácida comprende FA en agua. En modos de realización, el medio de dilución comprende una concentración de un 0,05 % a un 0,2 % (v/v), en particular en una concentración de aproximadamente un 0,1 % (v/v) de FA en agua. En modos de realización, el ácido está presente en una cantidad para ajustar el pH de una muestra que se va a analizar a un pH de aproximadamente 1 a aproximadamente 4, en particular el pH se ajusta a aproximadamente 2,7.

En modos de realización, el kit comprende medios de enriquecimiento adaptados para llevar a cabo al menos una etapa de enriquecimiento, en particular una etapa de separación de unidos/libres y/o una etapa cromatográfica. En modos de realización, el medio de enriquecimiento comprende una fase sólida que puede

estar compuesta de partículas sólidas, por ejemplo, partículas magnéticas o paramagnéticas, o de una fase sólida no particulada.

5 En modos de realización particulares, la fase sólida transporta grupos para la unión selectiva de fragmentos N terminales generados proteolíticamente de moléculas de cadena β de hemoglobina A, por ejemplo, grupos orgánicos hidrófobos. En otros modos de realización particulares, los medios de enriquecimiento pueden comprender una columna cromatográfica, en particular una columna cromatográfica para realizar una etapa cromatográfica.

10 En modos de realización, el medio de elución opcionalmente comprendido en el kit comprende una solución acuosa que comprende un disolvente orgánico miscible en agua, en particular acetonitrilo (ACN). El disolvente orgánico miscible en agua, en particular el ACN, está presente en una cantidad de aproximadamente un 5 a aproximadamente un 20 %, por ejemplo, de aproximadamente un 10 % (v/v).

15 El kit se puede proporcionar como un envase único que comprende recipientes de los componentes individuales o como un conjunto de varios envases, comprendiendo cada uno un recipiente de los componentes individuales.

20 En modos de realización, el kit comprende además un prospecto del envase. En modos de realización, el prospecto del envase comprende información sobre las indicaciones, uso, rendimiento y/o advertencias que se refieren al kit.

Un tercer aspecto de la presente invención es el uso de un sistema de diagnóstico para determinar la HbA1c glucada en una muestra realizando el procedimiento como se describe anteriormente.

25 El sistema de diagnóstico usado de acuerdo con la invención comprende:

(i) al menos una estación para la preparación de muestras que comprenden fragmentos N terminales de moléculas de HbA1c, en la que la preparación comprende una digestión proteolítica parcial de moléculas de hemoglobina A (HbA) para proporcionar una mezcla que comprende moléculas de cadena β de HbA intactas y
30 moléculas de cadena β de HbA digeridas proteolíticamente, en la que se digieren de un 1 % a un 20 % de las moléculas de cadena β de HbA en una muestra en base a la cantidad total de moléculas de cadena β de HbA originalmente presentes en la muestra, en particular en la que la estación comprende endopeptidasa Glu-C,

(ii) opcionalmente al menos una estación de enriquecimiento adaptada para enriquecer selectivamente
35 fragmentos N terminales de moléculas β de hemoglobina A a partir de la muestra, y

(iii) al menos una estación adaptada para el análisis de fragmentos N terminales de moléculas de hemoglobina A mediante espectrometría de masas (EM) y determinar la cantidad o concentración de HbA1c en la muestra.

40 Con respecto a modos de realización particulares del tercer aspecto de la presente invención, se hace referencia a todos los modos de realización descritos anteriormente en detalle en el contexto del primer y segundo aspecto.

45 En modos de realización particulares, el sistema de diagnóstico se adapta para permitir un alto rendimiento de muestras, en particular para permitir un rendimiento de hasta 100 muestras/hora o más. Por ejemplo, se puede usar un sistema como se describe en el documento WO 2017/103180.

50 En modos de realización particulares, el sistema de diagnóstico comprende al menos una estación para la preparación de muestras de acceso aleatorio y al menos una estación para el enriquecimiento de los fragmentos N terminales de moléculas de cadena β de hemoglobina A antes del análisis por EM.

55 En modos de realización, dicho sistema de diagnóstico comprende una estación de preparación de muestras para la preparación automatizada de muestras que comprenden fragmentos N terminales de moléculas de cadena β de hemoglobina A. En modos de realización particulares, dicha estación comprende una sección para hemolizar una o más muestras y una sección para proporcionar una digestión proteolítica parcial de moléculas de HbA en una o más muestras.

60 En modos de realización, dicho sistema de diagnóstico comprende además una estación de enriquecimiento. Dicha estación de enriquecimiento comprende una sección para poner en contacto una o más muestras después de una digestión proteolítica parcial con medios de enriquecimiento, en particular con una fase sólida, en particular partículas magnéticas o paramagnéticas. Adicionalmente o de forma alternativa, la estación de enriquecimiento comprende una sección cromatográfica, en particular una sección de CL. En modos de realización, la sección de CL comprende uno o más canales de CL. En modos de realización en los que la sección de CL comprende más de un canal de CL, los canales se pueden disponer en paralelo.

65 En modos de realización, el sistema de diagnóstico comprende al menos una interfaz entre las diferentes secciones y estaciones para introducir las muestras previamente preparadas en la sección o estación posterior.

En modos de realización, el sistema de diagnóstico comprende además un controlador que se puede programar para asignar muestras a flujos de trabajo predefinidos de preparación y enriquecimiento de muestras, cada uno comprendiendo una secuencia predefinida de etapas de preparación y enriquecimiento de muestras y requiriendo un tiempo predefinido para su finalización.

En modos de realización particulares, el controlador planifica una secuencia de entrada en canal de estación de enriquecimiento para introducir las muestras preparadas que permite eluir fragmentos N terminales de moléculas de cadena β de HbA de diferentes canales de estación de enriquecimiento en una secuencia de salida de eluido que no se superponga en base a los tiempos de elución esperados.

En modos de realización, el controlador establece e inicia una secuencia de inicio de preparación de muestras que genera una secuencia de salida de muestras preparadas de la estación de preparación de muestras que coincide con la secuencia de entrada en canal de estación de enriquecimiento, de modo que, cuando se completa la preparación de una muestra, el canal de estación de enriquecimiento asignado también está disponible y la muestra preparada se puede introducir en el canal de estación de enriquecimiento asignado antes de que se complete la preparación de otra muestra o antes de que la siguiente muestra preparada llegue a la interfaz de preparación/enriquecimiento de muestras.

En modos de realización, el controlador establece un periodo de referencia para la sincronización apropiada de los flujos de trabajo. Esto hace posible coordinar las siguientes etapas de procesamiento: (1) iniciar la preparación de como máximo una muestra por cada periodo de referencia con uno o más periodos de referencia posibles entre muestras consecutivas en la secuencia de inicio de preparación de muestras; y/o (2) completar la preparación de como máximo una muestra por cada periodo de referencia con uno o más periodos de referencia posibles entre muestras preparadas consecutivas de la secuencia de salida de muestras preparadas; y/o (3) introducir una muestra preparada por cada periodo de referencia en uno de los canales de estación de enriquecimiento con uno o más periodos de referencia posibles entre entradas en canal de estación de enriquecimiento consecutivas; y/o (4) emitir un eluido de estación de enriquecimiento por cada periodo de referencia con uno o más periodos de referencia posibles entre eluidos de estación de enriquecimiento consecutivos.

En lo que sigue, la presente invención se expone con más detalle mediante los ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Determinación de fragmentos peptídicos de HbA1 en sangre completa

Se diluyó una muestra de sangre completa de 100 μ l con 900 μ l de H₂O y se mezcló mediante agitación en vórtex durante 10 s hasta que se obtuvo una solución transparente. A continuación, se diluyeron adicionalmente 5 μ l de la muestra de sangre completa hemolizada con 20 μ l de H₂O. Se añadieron 5 μ l de la muestra de sangre hemolizada diluida, 15 μ l de endoproteinasa Glu-C (2 mg/ml) y 30 μ l de tampón de digestión (acetato de amonio 50 mM, pH 4,3) a un vial LoBind (Eppendorf) y se incubó durante 45 min a 37 °C para proporcionar una digestión parcial, por ejemplo, una digestión de un 1 a un 20 % de las moléculas de HbA presentes en la muestra. Se detuvo la reacción enzimática añadiendo 950 μ l de ácido fórmico al 0,1% (v/v).

A continuación, se proporcionaron varios lotes de 100 μ l de microesferas magnéticas hidrófobas (50 mg/ml). Se añadieron 200 μ l de la muestra de sangre completa digerida y 700 μ l de H₂O con ácido fórmico al 0,1% (v/v) a cada lote de microesferas magnéticas. Se agitaron las mezclas a 37 °C y 1200 rpm durante 5 min.

Seguidamente, se lavaron las microesferas dos veces usando 900 μ l de ácido fórmico acuoso al 0,1 % (v/v). Posteriormente, se añadieron 900 μ l de medio de elución (agua con ácido fórmico al 0,1% que contenía diferentes cantidades de acetonitrilo (ACN), es decir, 5 % (v/v), 10 % (v/v), 15 % (v/v), 20 % (v/v) y 30 % (v/v)) a cada lote de microesferas cargadas. Se agitaron las mezclas a 37 °C y 1200 rpm durante 1 min y se recogieron los sobrenadantes.

De cada lote se recogieron 500 μ l de medio de elución para someterlos a prueba. Se inyectó 1 μ l en una columna de fase inversa (Symmetry C18, cartucho Sentry Guard 300A, 3,5 μ m, 2,1 x 10 mm; Waters). A continuación, se llevó a cabo una elución isocrática usando ACN acuoso al 10 % con ácido fórmico al 0,1 % a 900 μ l/min. El tiempo total de desarrollo fue de 12 s.

Los parámetros para EM/EM fueron como sigue:

Tipo de fuente de iones: ESI

Voltaje de pulverizador:

- Estático

5 - Ion positivo (V): 3500,00

- Ion negativo (V): 2500,00

10 - Gas envolvente (Arb): 50

- Gas auxiliar (Arb): 25

- Gas de barrido (Arb): 3

15 - Temperatura del tubo de transferencia de iones (°C): 350

- Temperatura del vaporizador (°C): 400

En la tabla 1 se indican los parámetros de medición para HbA0 y HbA1c:

20

	Compuesto	Tiempo de inicio (min)	Tiempo de finalización (min)	Polaridad	Precursor (m/z)	Producto (m/z)	Energía de colisión (V)	Lente de RF (V)
1	HbA0	0	0,6	Positiva	348,288	236,968	22,944	47
2	HbA1c	0	0,6	Positiva	429,342	245,054	16,522	52

La figura 1 muestra los picos de EM/EM de péptidos de HbA1c y HbA0 obtenidos mediante digestión de una muestra de sangre completa con Glu-C.

25 En la tabla 2 se indican los resultados de medición para el coeficiente de variación (CV) de réplicas (n=3) con respecto a las cantidades de HbA0 y HbA1c y la proporción HbA1c/HbA0 obtenida con diferentes cantidades de acetonitrilo (ACN) en el medio de elución:

	% de DER	HbA0	HbA1c	HbA1c/HbA0
Flujo de trabajo con microesferas para sangre completa y ACN al 5 %		0,5	2,7	3,1
Flujo de trabajo con microesferas para sangre completa y ACN al 10 %		1,2	2,0	1,0
Flujo de trabajo con microesferas para sangre completa y ACN al 15 %		0,7	1,1	0,6

30 La figura 2 muestra el resultado de la digestión de muestras de sangre completa con Glu-C sin purificación adicional (arriba) y con purificación de muestras mediante enriquecimiento en microesferas magnéticas, seguido de lavado y elución con diferentes concentraciones de ACN, a saber ACN al 5 % (v/v), ACN al 10 % (v/v), ACN al 15 % (v/v), ACN al 20 % (v/v) y ACN al 30 % (v/v), respectivamente. La elución con ACN, en particular en cantidades de ACN al 5 % o 10 %, permite la elución específica de HbA1c y HbA0 y, por tanto, el enriquecimiento antes de la CL-EM.

35

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG
5	<120>	Flujo de trabajo de muestras a alta velocidad para medición de HbA1c basada en CL-EM
	<130>	65851P WO
10	<150>	EP19152309.1
	<151>	17/01/2019
	<160>	1
15	<170>	PatentIn versión 3.5
	<210>	1
	<211>	16
	<212>	PRT
20	<213>	Homo sapiens
	<400>	1
		Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Ser Ala Val Thr Ala Leu Trp Gly
		1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para determinar glucohemoglobina A (HbA1c) en una muestra, que comprende:
 - 5 (a) proporcionar una muestra que comprende moléculas de hemoglobina A (HbA),
 - (b) someter la muestra de la etapa (a) a una etapa de digestión proteolítica parcial en la que se generan fragmentos N terminales de moléculas de cadena β de hemoglobina A, y en la que se obtiene una mezcla que comprende moléculas de cadena β de HbA intactas y moléculas de cadena β de HbA digeridas proteolíticamente,
 - 10 en el que, en la etapa de digestión proteolítica parcial (b), se digieren de un 1 % a un 20 % de las moléculas de cadena β de HbA presentes en la muestra en base a la cantidad total de moléculas de cadena β de HbA originalmente presentes en la muestra,
 - 15 (c) opcionalmente enriquecer los fragmentos N terminales de moléculas de cadena β de hemoglobina A generados en la etapa (b), y
 - (d) someter la muestra que comprende fragmentos N terminales de moléculas de cadena β de hemoglobina A a un análisis por espectrometría de masas (EM) en el que se determina la cantidad o concentración de HbA1c en la muestra.
 - 20
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra en la etapa (a) es una muestra de sangre completa hemolizada, en particular una muestra de sangre completa humana hemolizada.
- 25 3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que, en la etapa de digestión proteolítica parcial (b), se digieren de un 5 % a un 10 % de las moléculas de cadena β de HbA presentes en la muestra en base a la cantidad total de moléculas de cadena β de HbA originalmente presentes en la muestra.
- 30 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la digestión proteolítica parcial en la etapa (b) se lleva a cabo con una enzima proteolítica que genera un fragmento N terminal de la molécula de cadena β de hemoglobina A que tiene una longitud en el intervalo de 4-20 aminoácidos, en particular en el intervalo de 5-15 aminoácidos, y más en particular en el que la enzima proteolítica escinde una molécula de cadena β de hemoglobina A después de la posición aminoacídica 6, 8 o 14 de acuerdo con SEQ ID NO: 1.
- 35 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la digestión proteolítica parcial en la etapa (b) se lleva a cabo con una endopeptidasa, en particular con una endopeptidasa seleccionada del grupo que consiste en Glu-C, tripsina, pepsina y termolisina.
- 40 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la digestión proteolítica parcial en la etapa (b) se lleva a cabo durante un periodo de tiempo de menos de 60 min, en particular menos de 45 min, o menos de 30 min.
- 45 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la digestión proteolítica en la etapa (b) se lleva a cabo con la endopeptidasa Glu-C, en particular a una concentración de 0,6 mg/ml durante un periodo de tiempo de 15 min a 45 min a una temperatura de 37 °C, en un tampón que comprende iones amonio, y la digestión se detiene añadiendo ácido fórmico en agua, en particular FA al 0,1 % (v/v) en agua.
- 50 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que, en la etapa de enriquecimiento (c), los fragmentos N terminales de moléculas de cadena β de hemoglobina A se enriquecen mediante elución selectiva de la fase sólida, en particular en presencia de acetonitrilo a aproximadamente un 5-20 % (v/v), más en particular en presencia de acetonitrilo a aproximadamente un 10 % (v/v).
- 55 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la etapa (d) comprende un análisis por EM/EM, en particular un análisis por EM/EM de fragmentos N terminales de moléculas de cadena β de hemoglobina A.
- 60 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que se determina la proporción de glucohemoglobina A (HbA1c) con respecto a hemoglobina A no glucada (HbA0) o a hemoglobina A total (HbA).
- 65 11. Uso de un kit que comprende
 - (i) una enzima para la digestión proteolítica parcial de moléculas de cadena β de HbA, en particular en el que la enzima es la endopeptidasa Glu-C, y opcionalmente un tampón de digestión para dicha enzima,
 - (ii) un medio de parada, que puede detener una digestión proteolítica con la enzima de (i),

en el que la enzima (i) y el medio de parada (ii) se adaptan para proporcionar una mezcla que comprende moléculas de cadena β de HbA intactas y moléculas de cadena β de HbA digeridas proteolíticamente, en la que se digieren de un 1 % a un 20 % de las moléculas de cadena β de HbA en una muestra en base a la cantidad total de moléculas de cadena β de HbA originalmente presentes en la muestra, y

(iii) opcionalmente, medios de enriquecimiento para enriquecer las moléculas de HbA1c digeridas proteolíticamente, y

(iv) opcionalmente, un medio de elución que comprende un disolvente orgánico miscible en agua para su uso en la elución de componentes de muestra de los medios de enriquecimiento de (iii)

en un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

12. Uso de un sistema de diagnóstico para determinar glucohemoglobina A (HbA1c) en una muestra, que comprende

(i) al menos una estación para la preparación de muestras que comprenden fragmentos N terminales de moléculas de HbA1c, en la que la preparación comprende una digestión proteolítica parcial de moléculas de hemoglobina A (Hb1) para proporcionar una mezcla que comprende moléculas de cadena β de HbA intactas y moléculas de cadena β de HbA digeridas proteolíticamente, en la que se digieren de un 1 % a un 20 % de las moléculas de cadena β de HbA en una muestra en base a la cantidad total de moléculas de cadena β de HbA originalmente presentes en la muestra, en particular en la que la estación comprende endopeptidasa Glu-C,

(ii) opcionalmente al menos una estación de enriquecimiento adaptada para enriquecer selectivamente fragmentos N terminales de moléculas β de hemoglobina A a partir de la muestra, y

(iii) al menos una estación adaptada para el análisis de fragmentos N terminales de moléculas de hemoglobina A mediante espectrometría de masas (EM) y determinar la cantidad o concentración de HbA1c en la muestra en el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

Figura 1

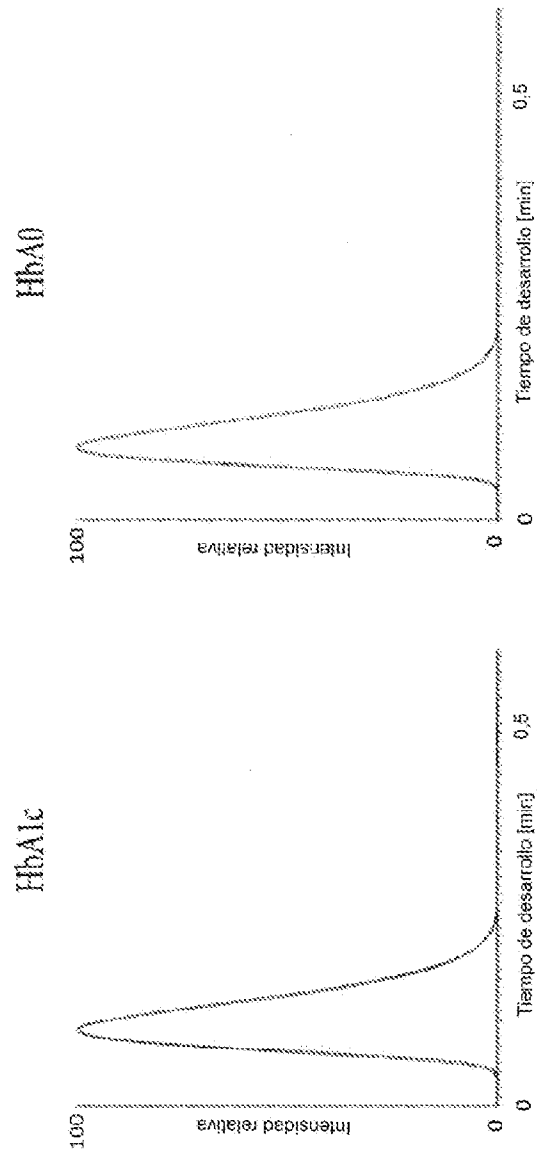


Figura 2

