



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 347 920**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/72 (2006.01)
C12Q 1/37 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **07801434 .7**
(96) Fecha de presentación : **19.07.2007**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2047279**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **15.04.2009**

(54) Título: **Reactivo para la digestión de la hemoglobina.**

(30) Prioridad: **21.07.2006 EP 06015220**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.11.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.11.2010

(73) Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

(72) Inventor/es: **Duelffer, Thomas;**
Von der Eltz, Herbert;
Kobold, Uwe;
Vogt, Bernd y
Herrmann, Rupert

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 347 920 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).

REACTIVO PARA LA DIGESTIÓN DE LA HEMOGLOBINA

Descripción**5 Introducción**

La invención se refiere a un reactivo para la digestión de la hemoglobina, que comprende un tampón, pepsina y una sal 1,3-dialquil-imidazolio. También da a conocer la utilización de dicho reactivo en un método para detectar
10 HbA1c, y un método de muestreo para la recolección de una muestra de sangre completa que comprende dicho reactivo para digerir la hemoglobina.

Antecedentes de la invención

La alteración del control de los niveles circulantes de
15 glucosa en sangre es la característica diagnóstica de la diabetes. La glucosa en sangre, en un proceso estadístico no enzimático, puede unirse a los residuos de lisina de los polipéptidos, conduciendo de esta manera a polipéptidos glucosilados. La glucosilación se observa frecuentemente en
20 proteínas que presentan una vida media prolongada. La proteína utilizada más frecuentemente para evaluar el control de largo plazo de los niveles circulantes de glucosa en sangre es la hemoglobina.

Existen numerosos métodos para determinar la
25 hemoglobina glucosilada. Se dividen básicamente en tres grupos dependiendo del modo en que se separan y cuantifican los componentes proteína glucosilada y no glucosilada (Goldstein D.E. et al., Clin. Chem. 32 (supl. 10):B64-B70, 1986).

30 El primer grupo consiste de métodos fisicoquímicos basados en la utilización de diferencias de carga. Entre

ellos se incluyen la determinación mediante HPLC con columnas intercambiadoras de cationes, tales como Diamat, MonoS y PolyCatA (método de Bisse), que son los métodos utilizados más frecuentemente en la química clínica. En el caso de la hemoglobina glucosilada, la evaluación cuantitativa habitualmente se lleva a cabo mediante una medición relativa de la señal de HbA1c en relación a la cantidad total de Hb (% de HbA1c).

Los métodos en el segundo grupo son aquellos que utilizan las diferentes reactividades químicas de las proteínas glucosilada y no glucosilada. Entre ellos se incluyen el método del ácido tiobarbitúrico, en el que, por ejemplo, la glucosa unida a la hemoglobina se convierte en un pigmento amarillo y se mide fotométricamente, y también los métodos de cromatografía de afinidad, en los que la formación de complejo entre los grupos diol vecinos del residuo azúcar y un grupo ácido bórico que se encuentra unido covalentemente a un soporte se utiliza para separar la hemoglobina glucosilada de la no glucosilada. Las clases de sustancia separadas se cuantifican fotométricamente y se calcula la cantidad relativa de hemoglobina glucosilada o, en el caso del método del ácido tiobarbitúrico, se cuantifica como determinación absoluta mediante calibración con materiales estándares adecuados.

En tercer lugar, pueden mencionarse los métodos inmunológicos. Se utilizan anticuerpos específicos en los métodos inmunológicos. Estos reconocen, por ejemplo, la unidad estructural en el extremo N-terminal de la cadena β de la molécula de hemoglobina glucosilada que es típica para

HbA1c (por ejemplo Tina quant® HbA1c, Roche Diagnostics GmbH, Alemania). En los métodos inmunológicos, se determina el contenido absoluto de tanto HbA1c como HbA0, respectivamente. Lo anterior requiere la utilización de
5 calibradores a los que se ha asignado una concentración diana mediante un método independiente. El contenido relativo de, por ejemplo, HbA1c no puede obtenerse mediante una medición directa.

HbA1c es la especie principal de glucohemoglobina en la
10 sangre humana. Se ha utilizado durante prácticamente 20 años para la evaluación de largo plazo del control glucémico en pacientes diabéticos. El ensayo integral de control y complicaciones de la diabetes (DCCT) ha proporcionado amplia evidencia de que las complicaciones microvasculares, tales
15 como la retinopatía, la nefropatía y la neuropatía se encuentran directamente relacionadas con el grado de hiperglucemia en los pacientes con diabetes dependiente de insulina (IDDM) y ha demostrado que la medición de la HbA1c en la sangre es una herramienta excelente para el
20 seguimiento de largo plazo del estado glucémico de los pacientes diabéticos (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus, Nathan
25 *et al.*, N. Engl. J. Med. 329:977-986, 1993; Santiago J.V., Diabetes 42:1549-1554, 1993; Benjamin J. y Sacks D.B., Clin. Chem. 40:683-687, 1994, y Goldstein D. *et al.*, Clin. Chem. 40:1637-1640, 1994). El estudio del DCCT también ha demostrado claramente la necesidad de mediciones fiables y

reproducibles de HbA1c y HbA0, la hemoglobina normal y no glucosilada, respectivamente.

Sin embargo, los métodos conocidos se asocian a varias desventajas. De esta manera, algunos de los métodos
5 físicoquímicos presentan una selectividad muy pobre debido a que las señales medidas de proteína glucosilada se solapan con las de las variantes no glucosiladas. Las formas de los picos cromatográficos con frecuencia son asimétricas y difíciles de integrar. Las columnas intercambiadoras de
10 cationes que se utilizan son susceptibles a pequeños cambios en las condiciones operativas y a la contaminación. Debido al bajo nivel de selectivamente, existe un riesgo elevado de medición de valores excesivamente altos (valores falsos positivos).

15 En el caso de los métodos químicos, resulta difícil estandarizar el procedimiento y las interferencias por parte de otros componentes que contienen azúcar únicamente pueden evitarse con grandes esfuerzos. No resulta posible diferenciar entre, por ejemplo, HbA1c y otras variantes
20 glucosiladas de la hemoglobina.

Los métodos inmunológicos se caracterizan por una selectividad muy elevada para las variantes glucosiladas de proteína. Sin embargo, la calidad de los resultados depende de la calidad del estándar utilizado para la calibración. En
25 la actualidad no se dispone de estándares primarios adecuados de calidad óptima, en particular para HbA1c. La información sobre las dependencias matriciales no puede obtenerse debido a la falta de un método de referencia adecuado. En este caso, con frecuencia también se obtienen

valores falsos positivos (ver, por ejemplo, Tiran A. *et al.*, J. Clin. Lab. Anal 8:128-134, 1994).

Kobold U. *et al.* (patente US n° 5.631.140) describen un método para la detección de proteínas glucosiladas como la hemoglobina que se basa en la digestión proteolítica de proteínas comprendidas en la muestra. Seguidamente, se lleva a cabo la detección de fragmentos peptídicos mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y espectrometría de masa (MS). Recientemente, Jeppsson J.-O. *et al.*, Clin. Chem. Lab. Med. 40:78-89, 2002, informaron de un método de referencia para la medición de HbA1c que ha sido aprobado por la International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). Este método se basa en la digestión de la hemoglobina. Las formas tanto glucosilada como no glucosilada se digieren enzimáticamente y se cuantifican mediante HPLC-MS los fragmentos peptídicos N-terminales de ambas formas de hemoglobina. En el corte enzimático de la hemoglobina se utiliza la endoproteinasa Glu-C de grado de secuenciación de Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania (n° de id. 1047817). Para conseguir la digestión completa de la hemoglobina, se propone una digestión durante la noche durante, por ejemplo, 18 horas, o una digestión con tripsina durante 2 horas, respectivamente.

La tripsina corta los enlaces peptídicos con la lisina y la arginina en el lado C-terminal del sitio de corte, es decir, corta entre los aminoácidos ocho y nueve de la hemoglobina. Jeppsson *et al.*, *supra*, pudieron demostrar que los residuos de lisina en la posición 8 en la cadena b también pueden encontrarse glucosilados en muestras con

niveles elevados de HbA1c, aunque no en aquéllas con niveles normales. De esta manera, la utilización de tripsina para liberar octapéptidos N-terminales con fines de cuantificación incluiría el riesgo de obtener octapéptidos
5 doblemente glucosilados u octapéptidos monoglucosilados en la posición Lys-1 o Lys-8, respectivamente. Por lo tanto, dichos investigadores concluyeron que el corte con tripsina no era utilizable. La endoproteinasa Glu-C corte la parte N-terminal de la cadena b entre los dos residuos de ácido
10 glutámico en las posiciones seis y siete. Los fragmentos resultantes contienen únicamente un solo sitio de glucosilación en la valina N-terminal y de esta manera pueden utilizarse para separar HbA1c. El sitio de corte real se expone fácilmente al enzima bajo condiciones suaves de
15 desnaturalización a pH 4,0. La desnaturalización completa previa a la digestión expone sustratos adicionales al sustrato y rinde una mezcla de péptidos más compleja. Mediante la utilización de las técnicas analíticas multidimensionales modernas de HPLC en línea y de
20 espectrometría de masas con electropulverización o el sistema fuera de línea de HPCL y de electroforesis capilar, han podido separarse y cuantificarse con el rendimiento analítico necesario los dos hexapéptidos β -N-terminales de HbA1c y HbA0. Mediante análisis de la mezcla de fragmentos
25 peptídicos resultante de la digestión con endoproteinasa Glu-C de muestras de sangre completa obtuvieron elevadas especificidad y sensibilidad en la medición de HbA1c.

Algunos enzimas proteolíticos conducen a fragmentos peptídicos que probablemente resultan generados a

velocidades diferentes. Esto a su vez resulta en una elevada variación de la concentración medida, o en un tiempo de incubación bastante largo. Un reactivo que se utilice para la digestión de la hemoglobina con el fin de evaluar la
5 fracción de hemoglobina glucosilada permitiría tanto una formación rápida como una formación estable de los fragmentos peptídicos deseados.

Tal como se apreciará, los tiempos de digestión prolongados suponen un menor rendimiento de muestras y son
10 caros. Para la rutina clínica resultaría altamente deseable un reactivo que garantizase la digestión rápida de la hemoglobina y que simultáneamente permitiese una cuantificación precisa de, por ejemplo, HbA1c y HbA0. Sin embargo, aparentemente los métodos de detección de la
15 hemoglobina que se basan en la digestión de la misma incluso actualmente requieren tiempos de incubación bastante prolongados y/o no conducen a fragmentos peptídicos estables.

Ahora se ha encontrado y establecido que puede
20 proporcionarse un reactivo proteolítico tal como el dado a conocer posteriormente y tal como se describe en las reivindicaciones adjuntas que resulta muy útil en la digestión de proteínas y que de esta manera conduce, por ejemplo, a una digestión rápida de hemoglobulina glucosilada
25 y no glucosilada.

Descripción resumida de la invención

La presente invención se refiere a un reactivo para la digestión de la hemoglobina que comprende un tampón, pepsina

y una sal 1,3-dialquil-imidazolio consistente de un catión 1,3-dialquil-imidazolio y un contraión.

Se da a conocer adicionalmente un método para medir HbA1c, comprendiendo el método las etapas de mezclar una muestra que contiene hemoglobina con un reactivo para la digestión de hemoglobina según la presente invención, digerir la hemoglobina durante 1 a 60 minutos, obteniendo de esta manera un fragmento de HbA1c que comprende los 14 aminoácidos N-terminales de HbA1c, medir dicho fragmento N-terminal de HbA1c y correlacionar el valor obtenido con la concentración de HbA1c.

En una realización adicional, se describe la utilización de una sal 1,3-dialquil-imidazolio consistente del catión 1,3-dialquil-imidazolio y un contraión para la digestión de la hemoglobina con pepsina en la medición de HbA1c.

La invención se refiere a un tubo de muestreo que comprende una composición de reactivo para la digestión de la hemoglobina tal como se da a conocer en la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Se describe un reactivo para la digestión de la hemoglobina, comprendiendo el reactivo: a) un tampón, b) pepsina y c) una sal 1,3-dialquil-imidazolio consistente de un catión 1,3-dialquil-imidazolio y un contraión.

El reactivo o mezcla de reactivos dados a conocer pueden utilizarse para digerir eficientemente la hemoglobina. La digestión enzimática es producida por la pepsina. La pepsina es uno de los tres enzimas principales

degradantes de proteínas, o proteolíticos, en el sistema digestivo, siendo los otros la quimiotripsina y la tripsina. Los tres enzimas son entre los primeros en ser aislados en forma cristalina. Durante el proceso de la digestión, estos
5 enzimas, cada uno de los cuales resulta particularmente eficaz en el corte de enlaces entre tipos particulares de aminoácidos, colaboran en la descomposición de proteínas de la dieta en sus componentes, es decir, péptidos y aminoácidos, que pueden ser fácilmente absorbidos por el
10 revestimiento intestinal.

La pepsina es sintetizada en una forma inactiva por el revestimiento del estómago; el ácido hidrocórico, que también produce la mucosa gástrica, resulta necesario para convertir el proenzima inactivo o zimógeno en el enzima
15 activo y para mantener la acidez óptima (pH 1 a 3) para el funcionamiento de la pepsina. Existen varias pepsinas, denominadas A, B, C y D. La pepsina A, el componente principal, presenta un peso molecular de 35.000 daltons y un pH óptimo de aproximadamente 1,0 para sustratos tales como
20 la caseína o la hemoglobina en el caso de que el sustrato sea proteína nativa. La pepsina corta las proteínas preferentemente en los grupos carboxílicos de aminoácidos aromáticos tales como la fenilalanina y la tirosina. No corta enlaces que contienen valina, alanina o glicina. Su
25 acción rompe cadenas largas de polipéptido en péptidos de menor longitud.

El reactivo según la presente invención se tampona para garantizar una acción rápida y eficiente de la pepsina. Debido a que la pepsina es más activa a un pH fuertemente

ácido, el tampón preferentemente se ajusta a un pH de entre 1 y 4. También resulte preferente que el pH se encuentre comprendido entre 1,5 y 3.

El experto en la materia podrá seleccionar
5 perfectamente un pH apropiado, así como un sistema tamponador apropiado. Los sistemas tamponadores ácidos pueden basarse, por ejemplo, en glicina o en citrato. Preferentemente se utiliza HCl para ajustar el pH según se desee.

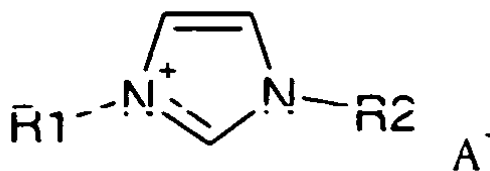
10 El concentración del tampón se ajusta para garantizar un pH apropiado en la digestión de la hemoglobina. Preferentemente el tampón presenta una concentración de entre 10 mM y 1 M. También resulta preferente que el tampón presente una concentración de entre 50 y 200 mM.

15 La pepsina (E.C.3.4.23.1) se somete a ensayo basándose en el método de Anson M.L., J. Gen. Physiol. 22:79-89, 1938, utilizando hemoglobina como el sustrato. Definición de unidades: una unidad causa un incremento de la absorbancia a 280 nm de 0,001/minuto a 37°C, pH 2,0. Preferentemente, en
20 el reactivo según la presente invención la pepsina se encuentra presente a una concentración de entre 30 y 6.000 U/ml.

Tal como se ha comentado anteriormente, en el caso de que se utilice pepsina para la digestión de la hemoglobina
25 bajo condiciones de digestión normales, aparte de la generación de otros fragmentos peptídicos, conduce a la formación de dos fragmentos N-terminales con 7 y 14 aminoácidos, respectivamente. Debido a que estos dos péptidos se forman a velocidades diferentes, no resulta

posible una determinación fiable de HbA1c, por ejemplo mediante la medición del péptido de 14 aminoácidos. Se ha encontrado, y se demuestra en la sección de ejemplos, que la pepsina en presencia de una sal 1,3-dialquil-imidazolio, conduce a una formación rápida y estable del fragmento peptídico N-terminal de 14 aminoácidos de la hemoglobina. Por lo tanto, el reactivo según la presente invención comprende una sal 1,3-dialquil-imidazolio.

Formula I: sal 1,3-dialquil-imidazolio



en la que R^1 y R^2 representan independientemente residuos alquilo y en la que A representa un contraión.

Preferentemente, los residuos alquilos de la sal 1,3-dialquil-imidazolio comprendidos en un reactivo según la presente invención se seleccionan de entre metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo o isobutilo. También resulta preferente que dos residuos alquilo en dicho 1,3-dialquil-imidazolio se seleccionen independientemente de entre metilo, etilo o propilo.

El reactivo según la presente invención comprende la sal 1,3-dialquil-imidazolio en una concentración apropiada para conseguir los efectos ventajosos sobre la actividad de la pepsina y la digestión de las proteínas. Preferentemente se encuentra comprendido a una concentración final de entre 1% y 25%. También resulta preferente que la concentración de

la sal 1,3-dialquil-imidazolio en un reactivo según la presente invención se encuentra comprendida en el intervalo de entre 2% y 20%, o de entre 4% y 15%.

El experto en la materia apreciará fácilmente que el
5 contraión contenido en la sal 1,3-dialquil-imidazolio contendrá una carga negativa y no resulta crucial. Preferentemente el contraión se selecciona de entre fosfato, alquilfosfato, sulfato y alquilsulfato.

La mezcla de reactivo según la presente invención ha
10 demostrado ser ventajosa en la digestión de la hemoglobina y se espera que resulte ventajosa en la digestión de cualquier proteína tal como, por ejemplo, comprendida en suero humano. Se espera que se observe la acción más rápida y más constante de la pepsina de manera análoga sobre cualquier
15 otro polipéptido de interés. Ello facilitará el análisis de la composición global de proteínas séricas o de otras proteínas individuales comprendidas en la misma.

Se describe un método para medir HbA1c, comprendiendo el método las etapas siguientes: a) mezclar una muestra que
20 contiene hemoglobina con un reactivo según la presente invención, b) digerir la hemoglobina durante 1 a 60 minutos, obteniendo de esta manera un fragmento de hemoglobina que consisten de los 14 aminoácidos N-terminales de HbA1c, y c) medir dicho fragmento N-terminal de HbA1c.

25 La presente invención también se refiere a un método para medir la concentración relativa de HbA1c en hemoglobina total, comprendiendo el método las etapas de mezclar la muestra que contiene hemoglobina con un reactivo para la digestión de la misma, comprendiendo el reactivo: (a) un

tampón, (b) pepsina, y (c) una sal 1,3-dialquil-imidazolio que consiste de un catión 1,3-dialquil-imidazolio y un contraión, digerir la hemoglobina durante 1 a 60 minutos, obteniendo de esta manera un fragmento de hemoglobina que
5 consiste de los 14 aminoácidos N-terminales de la hemoglobina que se encuentran glucosilados o no glucosilados, respectivamente; medir tanto dicho fragmento N-terminal glucosilado como dicho fragmento N-terminal no glucosilado de la hemoglobina, respectivamente, y
10 correlacionar los valores obtenidos en (c) con la concentración relativa de HbA1c en hemoglobina total.

Tal como se muestra en los ejemplos con la mezcla de reactivo según la presente invención, resulta posible digerir hemoglobina de manera extremadamente rápida, es
15 decir, ya se observa la digestión máxima tras aproximadamente un minuto. También se ha encontrado que el fragmento peptídico que consiste de los 14 aminoácidos N-terminales de la hemoglobina permanece estable durante por lo menos una hora. Lo anterior resulta cierto para el
20 fragmento peptídico N-terminal de HbA1c tanto no glucosilado (HbA0) como glucosilado. Estos resultados facilitan mucho la manipulación de las muestras y permite una planificación flexible de las mediciones de HbA0 y HbA1c, respectivamente. Debido a estas mediciones estables, el cálculo del % de
25 HbA1c no se encuentra sometido a variación y de esta manera es bastante preciso y fiable.

Los fragmentos N-terminales de 14 aminoácidos de HbA0 y HbA1c, respectivamente, pueden cuantificarse mediante cualquier medio apropiado. En una realización preferente, la

cuantificación se consigue mediante procedimientos inmunológicos. En una realización preferente adicional, se lleva a cabo la medición de dichos péptidos mediante HPLC y espectrometría de masas.

5 Una realización preferente adicional se refiere a la utilización de una sal 1,3-dialquil-imidazolio que consiste del catión 1,3-dialquil-imidazolio y un contraión para la digestión de la hemoglobina por parte de la pepsina, en la medición de HbA1c.

10 Puede resultar deseable y ventajoso recoger directamente una muestra de sangre completa en un tubo de muestreo que contiene un reactivo según la presente invención. Por lo tanto, en una realización preferente, la invención se refiere a un tubo de muestreo que comprende una
15 composición de reactivo según la presente invención.

Los ejemplos siguientes se proporcionan para ayudar a entender la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que pueden realizarse modificaciones en los procedimientos
20 proporcionados sin apartarse del espíritu de la invención.

Ejemplo 1

Procedimiento general para la proteólisis de la hemoglobina (Hb)

Se mezcla una alícuota de 24 microlitros de solución de
25 hemoglobina que contiene 0,2 mg/ml de hemoglobina y acetato amónico 50 mM (pH 4,3) con 216 µl de una solución que contiene pepsina (300 U/ml) en ácido cítrico 20 mM, pH 2,4, y opcionalmente una sal 1,3-dialquil-imidazolio (al 10% en peso/volumen). La solución de reacción se mantiene a

temperatura ambiente hasta la medición. Se realiza la medición con HPLC-MS (ver el Ejemplo 2) tras los tiempos de digestión de 1 minuto, 11, 21, 31, 41, 51 y 61 minutos, respectivamente. Se informa de la cantidad de los péptidos N-terminales [1-14] derivados de la cadena beta de HbA0 y de HbA1c tal como resulta liberada por la digestión con pepsina y la proporción entre estos péptidos (HbA1c y HbA0).

Ejemplo 2

Medición de los péptidos N-terminales de HbA0 y de HbA1c con HPLC-MS

Se inyectaron en la HPLC 10 µl del digerido tal como se obtuvo en el Ejemplo 1:

los sistemas de HPLC consisten de un cromatógrafo líquido HP 1090 (Agilent) con un sistema de administración de solvente DR 5, un automuestreador dotado de termostato, un autoinyector y una válvula de descarga entre la HPLC y el espectrómetro de masas. El detector era un espectrómetro de masas-trampa lineal de iones Thermo Electron LTQ con ionización por electropulverización. Para la separación cromatográfica, se utilizó una columna de HPLC que presentaba partículas Symmetry C18 como material del lecho, un diámetro interno de columna de 2 mm, una longitud de columna de 200 mm y una fritada con tamaño de poro de 0,5 µm. El eluyente era un gradiente de agua con ácido fórmico al 0,1% (A) a acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1% (B), 1 minuto de 100% de A, en 4 minutos hasta 15% de B y después en 2 minutos hasta 50% de B. El caudal era de 0,2 ml/minuto. Los péptidos HbA0

y HbA1c [1-14] eluyeron aproximadamente a los 4,4 a 5,2 minutos, respectivamente. La detección se realizó a partir de la transición MS/MS, HbA0 m/z 748,5 a 683,2, y HbA1c m/z 829,1 a 802,0.

5 Los resultados para la digestión de la hemoglobina obtenidos mediante la adición de etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio, metilsulfato de 1-butil-3-metilimidazolio o sin adición de una sal 1,3-dialquil-imidazolio, se proporcionan en las Tablas 1 a 3, respectivamente.

10 **Tabla 1: resultados de la digestión para el etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio**

Etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio				
		748,5->683,2	829,1->802,0	
		área (ms2)	área (ms2)	proporción
	T[min.]	A0 β[1-14]	A1c β[1-14]	A1c/A0 β[1-14]
	1	561880	319759	0,5691
	11	559011	304845	0,5453
	21	538150	283047	0,5260
	31	524271	278103	0,5305
	41	502545	277339	0,5519
	51	488469	269000	0,5507
	61	482869	268930	0,5569
media		522456	285860	0,547
s		32298	19240	0,01
VK(%)		6	7	3
VK(%)n.11 minutos		6	5	2
VK(%)n.21 minutos		5	2	3

Tabla 2: resultados de la digestión para el metilsulfato de 1-butil-3-metilimidazolio

Metilsulfato de 1-butil-3-metilimidazolio				
		748,5->683,2	829,1->802,0	
		área (ms2)	área (ms2)	proporción
	T[min.]	A0 β[1-14]	A1c β[1-14]	A1c/A0 β[1-14]
	1	480903	271838	0,5653

	11	543371	281675	0,5184
	21	510676	280444	0,5492
	31	483673	289468	0,5985
	41	496431	276577	0,5571
	51	472372	269102	0,5697
	61	478487	256608	0,5363
media		495130	275102	0,556
s		24830	10559	0,03
VK (%)		5	4	5
VK (%) n.11 minutos		5	4	5
VK (%) n.21 minutos		3	5	4

Tabla 3: resultados de la digestión sin sal imidazolio

		Etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio		
		748,5->683,2	829,1->802,0	
		área (ms2)	área (ms2)	proporción
	T[min.]	A0 β[1-14]	Alc β[1-14]	Alc/A0 β[1-14]
	1	515579	267266	0,5184
	11	565225	343742	0,6082
	21	588113	314792	0,5353
	31	499632	349421	0,6994
	41	511829	347366	0,6787
	51	592245	349365	0,5899
	61	589784	343078	0,5817
media		551772	330719	0,602
s		41248	30487	0,07
VK (%)		7	9	11
VK (%) n.11 minutos		7	4	10
VK (%) n.21 minutos		8	4	11

Reivindicaciones

1. Método para la medición de HbA1c, comprendiendo el
5 método las etapas siguientes:

a) mezclar una muestra que contiene hemoglobina con un reactivo para la digestión de la hemoglobina, comprendiendo el reactivo:

aa) un tampón,
10 ab) pepsina, y
ac) una sal 1,3-dialquil-imidazolio de un catión 1,3-dialquil-imidazolio y un contraión.

b) digerir la hemoglobina durante 1 a 60 minutos, obteniendo de esta manera un fragmento de hemoglobina que
15 comprende los 14 aminoácidos N-terminales de HbA1c, y

c) medir dicho fragmento N-terminal de HbA1c.

2. Método según la reivindicación 1, en el que el tampón del reactivo para la digestión de la hemoglobina presenta un pH comprendido entre 1 y 4.

20 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el tampón del reactivo para la digestión de la hemoglobina presenta una concentración de entre 10 mM y 1 M.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la pepsina contenida en el reactivo para la
25 digestión de la hemoglobina se encuentra presente a una concentración de entre 30 y 6.000 U/ml.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los dos residuos alquilo del 1,3-dialquil-imidazolio comprendido en el reactivo para la digestión de

la hemoglobina se seleccionan independientemente de entre metilo, etilo o propilo.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el contraión comprendido en el reactivo para la digestión de la hemoglobina se selecciona de entre fosfato, alquilsulfato, sulfato y alquilsulfato.

7. Utilización de una sal 1,3-dialquil-imidazolio que consiste del catión 1,3-dialquil-imidazolio y un contraión para la digestión de la hemoglobina por parte de la pepsina en la medición de HbA1c.

8. Tubo de muestreo que comprende un reactivo para la digestión de la hemoglobina, comprendiendo el reactivo:

- a) un tampón,
- b) pepsina, y
- 15 c) una sal 1,3-dialquil-imidazolio de un catión 1,3-dialquil-imidazolio y un contraión.