



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1010229-9 B1



(22) Data do Depósito: 30/06/2010

(45) Data de Concessão: 04/08/2020

(54) Título: MÉTODO PARA ANÁLISE IN VITRO POR ELETROFORESE CAPILAR, COMPOSIÇÃO TAMPÃO, KIT E USOS DE UMA COMPOSIÇÃO TAMPÃO E DE UM KIT

(51) Int.Cl.: G01N 27/447.

(30) Prioridade Unionista: 01/07/2009 FR 09/03220.

(73) Titular(es): SEBIA.

(72) Inventor(es): GÉRALD DESCHAMPS; DENIS SIMONIN; FRÉDÉRIC ROBERT.

(86) Pedido PCT: PCT FR2010000481 de 30/06/2010

(87) Publicação PCT: WO 2011/001045 de 06/01/2011

(85) Data do Início da Fase Nacional: 29/12/2011

(57) Resumo: MÉTODO PARA ANÁLISE POR ELETROFORESE CAPILAR, COMPOSIÇÃO TAMPÃO, KIT, USOS DE UM COMPOSTO, USOS DE UMA COMPOSIÇÃO TAMPÃO, USOS DE UM KIT E COMPOSTO. A presente invenção está relacionada a um método de análise de hemoglobinas glicadas por eletroforese capilar, ditas hemoglobinas glicadas que compreende pelo menos uma cadeia de globina que inclui um resíduo de glicose ligado ao aminoácido na posição N-terminal e sendo contidas em uma amostra biológica, em que o referido método compreende a implementação de uma composição tampão que compreende pelo menos um composto capaz de complexar especificamente resíduos de glicose de uma ou mais hemoglobina(s) glicada(s) e de fornecer a essa(s) hemoglobina(s) glicada(s) várias cargas elétricas negativas possuindo pH alcalino. Por exemplo, esse composto pode ser o ácido 3,4- ou 3,5-dicarboxifenilborônico, de preferência o ácido 3,5-dicarboxifenilborônico. O referido método pode ser usado, em particular, para separa e dosar a hemoglobina HbA10 presente em uma amostra biológica que compreende opcionalmente outras hemoglobinas, em particular outras frações menores. A presente invenção refere-se ainda as composições tampão úteis para essa análise, bem como a kits de análise e de dosagem de hemoglobinas glicadas por eletroforese capilar.

**“MÉTODO PARA ANÁLISE *IN VITRO* POR ELETROFORESE CAPILAR,
COMPOSIÇÃO TAMPÃO, KIT E USOS DE UMA COMPOSIÇÃO TAMPÃO E
DE UM KIT”**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] O presente pedido está relacionado ao campo da análise e da dosagem de hemoglobinas glicadas, em particular da hemoglobina A_{1c}, por eletroforese capilar.

[002] A presente invenção refere-se a um método de análise, por eletroforese capilar de uma amostra biológica, que compreende uma ou mais hemoglobina(s), e em particular uma ou mais hemoglobina(s) glicada(s), bem como composições tampão apropriadas para essa análise, kits de análise e de dosagem de hemoglobinas glicadas por eletroforese capilar.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] A hemoglobina (Hb) é uma molécula globular que compreende geralmente quatro subunidades, cada uma delas constituída por uma cadeia polipeptídica, conjugada com uma porção heme. As cadeias polipeptídicas são designadas coletivamente com o nome de porção globina da molécula de hemoglobina.

[004] Todas as hemoglobinas humanas são constituídas por quatro cadeias polipeptídicas idênticas duas a duas. Em um humano adulto, três tipos de hemoglobina estão normalmente presentes: a hemoglobina A (HbA) amplamente predominante (ela representa geralmente cerca de 97% da hemoglobina em um adulto), constituída de duas cadeias alfa e de duas cadeias beta (hemoglobina $\alpha_2\beta_2$), a hemoglobina A2 (HbA₂; ela representa geralmente cerca de 1-3% da hemoglobina em um adulto) constituída de duas cadeias alfa e duas cadeias delta (hemoglobina $\alpha_2\delta_2$) e a hemoglobina fetal (HbF), constituída por duas cadeias alfa e duas cadeias gama (da hemoglobina $\alpha_2\gamma_2$) que só persiste em quantidades residuais (geralmente inferiores a 1% da hemoglobina um

adulto) e permanece limitada a uma população celular restrita (as "células F").

[005] A hemoglobina contém espécies chamadas menores, que são hemoglobinas glicadas.

[006] A hemoglobina glicada (também denominada hemoglobina glicada ou glicohemoglobina) corresponde ao conjunto das moléculas de hemoglobina modificadas pela fixação de oses, principalmente de glicose, nas funções aminadas (NH_2) da globina; o grupo NH_2 de uma hemoglobina se condensa com um grupo de aldeído proveniente de um açúcar redutor. Essa reação, que não é enzimática é estabilizada em seguida por um rearranjo de Amadori. Os sítios de glicação N potenciais são os ácidos aminados N-terminais das quatro cadeias de globina da hemoglobina (cadeias α , β , δ ou γ de acordo com o tipo de hemoglobina) e os grupos amino-epsilon livres (em particular os dos resíduos de lisina) nas cadeias de globina da hemoglobina.

[007] Existem muitas formas de hemoglobina glicada em função do número de oses fixadas, da natureza das cadeias de globina e das oses fixadas nessas cadeias e da localização dessas oses nas cadeias de globina.

[008] O termo de hemoglobina glicada total é usado quando são consideradas as moléculas de hemoglobina glicadas em qualquer resíduo de NH_2 .

[009] O termo hemoglobina A1 (HbA1) é reservado às moléculas de hemoglobina A que possuem uma molécula de ose ligada ao aminoácido N-terminal de uma ou das duas cadeias beta da proteína. A fração A1, heterogênea, compreende em particular as frações menores A_{1a} , A_{1b} e principalmente A_{1c} . A hemoglobina A_{1a} (Hb A_{1a}) reúne a hemoglobina A_{1a1} (Hb A_{1a1}), na qual a ose ligada ao aminoácido N-terminal é a frutose 1,6-difosfato, e a hemoglobina A_{1a2} (Hb A_{1a2}), na qual a ose ligada ao aminoácido N-terminal é a glicose-6-fosfato. No caso da hemoglobina A_{1b} (Hb A_{1b}), a ose ligada ao ácido N-terminal amino é o piruvato. Finalmente, a ose ligada ao aminoácido das

cadeias beta da hemoglobulina A_{1c} (HbA_{1c}) é a glicose, e a HbA_{1c} é obtida por condensação de uma molécula de glicose com o grupo NH_2 da valina N-terminal da cadeia β , para formar uma cetoamina estável, após um rearranjo (rearranjo de Amadori) de uma aldimina instável previamente formada (denominada HbA_{1c} lábil ou $preA_{1c}$).

[010] Finalmente, o termo engloba geralmente sob o termo de hemoglobina A_0 (HbA_0) as hemoglobinas A não glicadas e as hemoglobinas A glicadas que não compreendem uma ose ligada ao aminoácido em posição N-terminal das cadeias β .

[011] A glicação de proteínas (por exemplo, a hemoglobina glicada e, em particular, a hemoglobina A_{1c} , entre tantas outras) é provocada pela concentração muito elevada de açúcares no sangue (como é o caso da diabete). A glicação das proteínas altera suas funções, o que provoca lesões celulares, tissulares, e um envelhecimento vascular e contribui para o desenvolvimento de várias doenças, tais como a arteriosclerose, a insuficiência renal, a retinopatia diabética e a catarata. Depois de glicosada, a hemoglobina glicada transporta bem menos oxigênio.

[012] Entre todos os grupos e subgrupos de hemoglobina, a HbA_{1c} apresenta um interesse particular porque serve de marcador de longo prazo do estado diabético dos pacientes. A formação da HbA_{1c} é dependente da glicemia (concentração de glicose no sangue). Ela ocorre durante todo o ciclo de vida dos glóbulos vermelhos, que é normalmente de 120 dias. A concentração sanguínea de HbA_{1c} reflete, portanto, uma média da glicemia nos 2-3 meses que antecedem a dosagem. A elevação da concentração sanguínea de HbA_{1c} é indicativa de uma hiperglicemia prolongada durante esse período. De fato, a concentração sanguínea de HbA_{1c} não é afetada por flutuações breves das taxas de glicose no sangue. Assim, medindo a taxa de HbA_{1c} entre duas datas, pode-se acompanhar a evolução de uma diabete.

[013] No paciente diabético, a finalidade é obter uma taxa de HbA_{1c} tão próxima quanto possível dos números que caracterizam um bom equilíbrio da glicemia. O valor de referência em um ser humano não diabético que possui uma glicemia normal é de 4 a 6% de HbA_{1c} no sangue em relação com a concentração total de hemoglobina A (hemoglobinas glicadas e hemoglobinas não glicadas) (ou seja, 20-42 mmol / mol; Panteghini et al, 2007).

[014] A detecção das hemoglobinas glicadas, em particular a detecção de um aumento da taxa de HbA_{1c}, apresenta, portanto, um interesse evidente para o diagnóstico da diabetes (de tipo 1 ou de tipo 2) ou o monitoramento de pacientes diabéticos e, em particular, para avaliar a eficácia de um tratamento contra a diabetes (de tipo 1 ou de tipo 2).

[015] No entanto, a interpretação dos resultados é às vezes delicada, pois muitos fatores podem falsear os resultados, em particular, a presença de hemoglobinas anormais.

[016] Hemoglobinas chamadas de "anormais" ou variantes, designadas pelas letras S, C, D, E, H e J, são de fato encontradas em alguns pacientes. A hemoglobina é então parcial ou totalmente substituída por uma ou mais hemoglobinas anormais. Elas provêm em particular de uma síntese reduzida de certas cadeias de globina e/ou de uma modificação de estrutura das cadeias α , β , γ , ou δ , por substituição de um aminoácido por outro. Assim, uma modificação que ocorre na cadeia β pode dar origem, por exemplo, a hemoglobinas S ou C (hemoglobinas $\alpha_2\beta_2$, nas quais o ácido glutâmico em posição 6 da cadeia β é substituído respectivamente por uma valina ou por uma lisina).

[017] Essas hemoglobinas anormais também são também suscetíveis de serem glicadas. Assim, existem em particular as hemoglobinas S_{1c} (HbS_{1c}) e C_{1c} (HbC_{1c}) que, como HbA_{1c}, compreendem uma molécula de glicose fixada na valina N-terminal das cadeias β (Abraham et al., 1984).

[018] Os métodos de análise e de dosagem da hemoglobina glicada e, em particular, da hemoglobina HbA_{1c}, podem ser classificados em duas grandes categorias.

[019] A primeira categoria, predominante, inclui métodos tais como os imunoenaios ou as cromatografias de afinidade. Ela se baseia nas características estruturais da molécula de açúcar ligada à hemoglobina. A título de exemplo, a publicação de Wilson et al., 1993 e a patente US 6.162.645 descrevem um método de dosagem por cromatografia de afinidade da hemoglobina glicada que se encontra em uma amostra de sangue humano. O referido método repousa sobre o uso de uma fase sólida positivamente carregada acoplada, por meio de um composto polianiônico (por exemplo, ácido poliacrílico) com ácido borônico, ácido fenilborônico ou um composto boronato similar. Quando uma amostra de sangue a ser analisado é incubada com essa fase sólida, os resíduos de glicose das moléculas de hemoglobina glicada presentes nessa amostra se complexam com o composto boronato. As moléculas de hemoglobina glicada encontram-se assim enxertadas na fase sólida. Pode-se, então, quantificar a proporção de hemoglobina glicada imobilizada na fase sólida em relação com a proporção de hemoglobina não imobilizada. Essa dosagem é realizada através da medição da extinção da fluorescência (Wilson et al., 1993) ou então usando anticorpos marcados dirigida contra hemoglobina humana (EUA 6.162.645).

[020] A segunda categoria de métodos de análise e de dosagem da hemoglobina glicada inclui a cromatografia de troca iônica ou a eletroforese. Ela explora as características físico-químicas das moléculas e repousa sobre a diferença de carga existente entre as proteínas glicadas e as proteínas não glicadas.

[021] Entre os diferentes métodos analíticos que permitem uma dosagem da hemoglobina glicada descritos na literatura, os métodos

eletroforéticos se dividem em várias categorias: as análises por gel incluem a análise por focalização isoeétrica em gel de poliacrilamida (Beccaria, 1978; Simon, 1982; Stickland, 1982; Bosisio, 1994) e a análise por gel de agarose (US 5.246.558; EUA 4.222.836; Menard, 1980). As análises por eletroforese capilar incluem a análise por focalização isoeétrica (Molteni, 1994; Hempe, 1994), a análise em solução livre que envolve um anti-A_{1c} (USA 5,431,793), a análise em solução livre em capilar nu (USA 5599433) e a análise em solução livre com revestimento ("coating") dinâmico (EP 0733900 A2, EUA 5,611, 903).

[022] A análise por eletroforese de uma amostra biológica permite separar as diferentes proteínas, em especial as diferentes hemoglobinas presentes na amostra, e determinar a quantidade e/ou a proporção de uma ou mais proteína(s) de interesse na amostra biológica. Em eletroforese capilar, em um capilar preenchido com um eletrólito, as proteínas de uma amostra biológica migram sob o efeito de um campo elétrico do ânodo para o catodo, em função de sua massa e de suas cargas. Elas formam assim um perfil de migração eletroforética que compreende uma série de picos (também chamados de frações), e cada um deles corresponde a uma ou mais proteínas. Assim, hemoglobinas anormais, tais como HbS, HbC e HbE apresentam uma mobilidade eletroforética diferente da mobilidade de HbA. Além disso, devido ao resíduo ose ligado ao aminoácido N-terminal das cadeias betas, a HbA₁ possui um ponto isoeétrico HbA₁ reduzido e, conseqüentemente, uma carga elétrica ligeiramente diferente da carga elétrica das outras hemoglobinas de tipo HbA₀. Assim, em um campo eletroforético ou em uma resina trocadora de íons, a HbA₁ apresenta uma velocidade de migração diferente da velocidade de migração da HbA₀, o que permite separar a HbA₁ da HbA₀, que está diferentemente carregada.

[023] A vantagem de eletroforese capilar reside também igualmente no fato de que somente quantidades muito pequenas de amostra

biológica para analisar são necessárias. Além disso, a separação por essa técnica pode ser muito rápida, pelo fato de que altas voltagens podem ser usadas sem que a amostra se aqueça muito durante a separação.

[024] A análise por focalização isoelétrica (Molteni, 1994; Hempe, 1994) é realizada em capilares revestidos. Para o revestimento ("coating"), é usada uma solução de metilcelulose. O católito utilizado é a soda (NaOH) e o ânólito do ácido fosfórico (H_3PO_4). Graça ao uso de anfólitos, essa análise permite separar variantes de hemoglobina bem como a HbA_{1c} cujo pico é muito próximo do pico da HbA ($\Delta pI < 0,10$). Embora esse método funcione bem, ele não é fácil de implementar em uma base rotineira e exige grande precisão, em particular na faixa de pH dos anfólitos (pois o ponto isoelétrico (pI) de HbA_{1c} está muito próximo ao de HbA₀).

[025] A análise em solução livre que envolve um anti-HbA_{1c} (US 5,431, 793) é realizada em tampão borato em pH básico (pH 8 a 10), em amostras submetidas a uma reação com um anticorpo monoclonal anti-HbA_{1c}. Mais precisamente, um primeiro eletroforegrama é realizado com a amostra de trabalho sem reação prévia com um anticorpo anti-HbA_{1c}. Um único pico é obtido, de área x, contendo todas as hemoglobinas (incluindo HbA_{1c}). Um segundo eletroforegrama é obtido pela análise da amostra de trabalho, previamente posta em contato com o anticorpo anti-HbA_{1c}. Foi separado assim o anticorpo anti-HbA_{1c} não ligado, o complexo anticorpo HbA_{1c}/HbA_{1c} e a hemoglobina não complexadas pelo anticorpo. A quantidade de HbA_{1c} é então determinada por diferença de área dos picos entre o pico do primeiro eletroforegrama e o do segundo relativo às hemoglobinas não complexadas pelo anticorpo anti-HbA_{1c} de área y, ou seja, uma quantidade x-y. Esse método mostra-se assim demorado e complicado de ser implementado.

[026] O método de análise em solução livre, em capilar nu (US 5,599,433) envolve um agente que complexa o açúcar ligado à hemoglobina (o

borato) e um tampão zwitteriônico (CAPS) de pH básico (pH 9 a12). O perfil obtido (mostrado na Figura 1 do presente pedido) nas condições descritas mostra uma separação relativamente pequena dos picos HbA₁ (descrito como sendo o pico de HbA_{1c} na Patente US 5,599,433) e HbA_{1c} (ver Exemplo 1). Além disso, a análise de frações menores purificadas mostra um co-migração de frações HbA_{1a,b} e HbA_{1c}, que interfere no resultado final da dosagem (ver exemplo 2 e figura 2 do presente pedido). De fato, essa técnica separa as frações HbAO e HbA1, mas não separa as frações HbA1 entre si.

[027] A técnica analítica por capilar com duplo revestimento dinâmico (EP 0733900 A2, US 5,611,903) é usada apenas no teste baseado na eletroforese capilar, que é comercializado (kit Analis CEofix™ HbA_{1c}). Ele consiste em uma primeira lavagem do capilar com um "iniciador" que contém um polication (em solução de pH 4.6), produzindo um revestimento da parede do capilar por esse polication. Uma segunda lavagem é em seguida realizada com um tampão de análise que contém um poliânion (pH 4,6), que tem por efeito adicionar uma segunda camada de revestimento por interação com o polication. A quantidade de cargas elétricas negativas então presente na parede interna do capilar é ainda mais elevada do que em um capilar nu, resultando em um fluxo eletro-osmótico ainda maior. A resolução obtida entre as diferentes formas de hemoglobina analisada (incluindo as hemoglobinas A1 glicadas) é satisfatória, com tempos de análise curtos. Do ponto de vista prático, esse revestimento duplo deve ser refeito entre cada análise por um procedimento preciso fornecido pelo fabricante do kit, mas que só foi descrito para um aparelho mono-capilar (P/ACE, Beckman), não adequado para análises de rotina.

[028] Persiste, portanto, uma necessidade de reagentes e um método simples de implementar que permita separar eficazmente as hemoglobinas glicadas, em particular HbA_{1c}, das outras hemoglobinas,

variantes, interferentes (formas lábeis, acetiladas, carbamiladas) e das outras frações menores (em particular HbA_{1a} e HbA_{1b}) presentes em uma amostra biológica que contém outras hemoglobinas. Idealmente, esse método permitiria obter uma dosagem semiquantitativa ou quantitativa de hemoglobinas glicadas, em particular da HbA_{1c}, diretamente a partir do perfil eletroforético obtido.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[029] A presente invenção propõe um método de eletroforese capilar alternativo, que permite realizar uma análise semiquantitativa ou quantitativa de uma ou mais de hemoglobina(s) glicada(s) que compreende pelo menos uma cadeia de globina que compreende um resíduo de glicose ligado ao aminoácido que se encontra em posição N-terminal, contida(s) em uma amostra biológica que compreende em particular outras hemoglobinas (glicadas e/ou não-glicadas). O referido método da presente invenção explora ao mesmo tempo as características estruturais das moléculas de glicose ligadas essas hemoglobinas glicadas e as diferenças de carga existentes entre as diferentes hemoglobinas da amostra.

[030] Os inventores demonstraram que usando uma composição tampão particular é possível obter uma separação amplamente melhorada da(s) hemoglobina(s) glicada(s) que compreendem um resíduo de glicose ligado ao aminoácido que se encontra em posição N-terminal em pelo menos uma cadeia de globina, em particular nas cadeias beta, e mais particularmente uma separação amplamente melhorada de HbA_{1c}.

[031] Uma das vantagens do método da presente invenção é permitir, devido ao uso da referida composição tampão, um deslocamento do pico de eletroforese que corresponde a um ou mais tipos de hemoglobina(s) glicada(s) de interesse (um ou mais tipos de hemoglobina(s) que compreendem um resíduo de glicose ligado ao aminoácido que se encontra

em posição N-terminal em pelo menos uma cadeia de globina, por exemplo 1HbA_{1c}) quando ela está presente em uma amostra biológica em relação à posição de pico, que seria obtida sem a composição tampão. Esse deslocamento não interfere com a separação de outras proteínas, em particular das outras hemoglobinas (glicada e/ou não-glicada) da amostra. Isto permite separar o particular a HbA_{1c} de outras HbA₁ menores (incluindo HbA_{1a} e HbA_{1b}). Conseqüentemente, esse método permite uma leitura confiável dos resultados do teste e uma dosagem precisa de uma ou mais de hemoglobina(s) glicada(s) de interesse que compreendem um ou mais resíduos (s) glicose com um resíduo de glicose ligado ao aminoácido que se encontra em posição N-terminal de pelo menos uma cadeia de globina (por exemplo, a hemoglobina A_{1c}).

[032] O método da presente invenção constitui, portanto, um método preferido para estabelecer um diagnóstico e um monitoramento dos pacientes diabéticos, em especial para avaliar a eficácia de um tratamento antidiabético.

[033] Assim, o presente pedido tem por objeto um método de análise, por eletroforese capilar, de hemoglobinas glicadas (uma ou mais hemoglobina(s) glicada(s)) que compreende um ou mais resíduo(s) de glicose, contidos em uma amostra biológica, que compreende uma ou mais hemoglobina(s), e o referido método compreende a utilização de uma composição tampão que compreende pelo menos um composto capaz, de um lado, de complexar especificamente resíduos de glicose (um ou mais resíduo(s)) de hemoglobina glicada (uma ou mais hemoglobina(s) glicada(s)) da amostra biológica e, de outro lado, fornecer a essas hemoglobinas glicadas várias carga(s) elétrica(s) negativa(s) em pH alcalino (isto é, de pH superior a 7).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[034] Por "vários" entende-se no sentido do presente pedido, pelo

menos dois, ou seja, dois ou mais de dois, por exemplo, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove dez ou mais de dez.

[035] Por "pelo menos um(a)" entende-se, no sentido do presente pedido, um(a) ou mais.

[036] O termo "hemoglobina" engloba, no sentido da presente invenção, qualquer forma ou fração de hemoglobina (inclusive as frações menores), seja ela normal ou anormal, bem como as diversas variantes dessas hemoglobinas (há menos pelo menos 1.000 variantes descritas da hemoglobina).

[037] Por "hemoglobina glicada" entende-se, no presente pedido, qualquer hemoglobina modificada pela fixação de um ou mais de açúcar(es), em particular de uma ou mais glicose, glicose-6-fosfato, frutose 1-6 difosfato ou piruvato, em um ou mais cadeia(s) de globina qualquer(qualsquer) que seja(m) a(s) cadeia(s) de globina. O(s) açúcar(es) pode(m) ser fixado(s) sobre um aminoácido que se encontra em posição N-terminal sobre uma cadeia de globina e/ou sobre um aminoácido que possui um grupo amino livre (lisina, por exemplo).

[038] O termo "cadeia de globina" designa, no presente pedido, qualquer cadeia de globina conhecida do técnico no assunto, em particular uma cadeia escolhida entre as cadeias alfa (α), beta (β), delta (δ) e gama (γ), sejam elas normais ou anormais, ou ainda uma variante de uma dessas cadeias. Em um modo de realização particular, a referida "cadeia de globina" é uma cadeia beta, por exemplo, uma cadeia beta uma hemoglobina A₁, em particular A_{1c}, S ou C.

[039] Quando nesses modos de realização da presente invenção, é feita referência à hemoglobina glicada, deve-se entender que os referidos modos de realização se aplicam em especial a cada tipo particular de hemoglobina glicada citado no presente pedido.

[040] Salvo indicação contrária, cada modo de realização descrito no presente aplica-se independentemente e/ou em combinação com qualquer uma ou várias dos outros modos de realização descritos.

[041] O método de análise por eletroforese capilar da presente invenção aplica-se a uma amostra biológica que compreende pelo menos uma hemoglobina glicada com um ou mais resíduo(s) de glicose e que compreende necessariamente, em uma ou mais cadeia(s) de globina e em particular nas cadeias beta, um resíduo de glicose ligado ao aminoácido localizado que se encontra em posição N-terminal. Essas hemoglobinas são chamadas de "hemoglobinas glicadas em posição N-terminal" no presente pedido.

[042] O referido método permite separar uma ou mais hemoglobina(s) glicada(s) em posição N-terminal da hemoglobina glicada das outras hemoglobinas glicadas (isto é, das hemoglobinas glicadas cujas cadeias de globina são desprovidas de resíduo de glicose ligadas ao aminoácido que se encontra em posição N-terminal) ou das hemoglobinas não-glicadas, que estão eventualmente presentes na amostra biológica analisada.

[043] De acordo com uma realização particular, o aminoácido que se encontra no N-terminal na(s) cadeia(s) beta é a valina.

[044] O método analítico da presente invenção é, em um modo preferido, destinado a analisar uma amostra biológica que compreende hemoglobina A_{1c}. Ele é em particular apropriado para separar a hemoglobina A_{1c} de outras ou das outras hemoglobinas (glicadas de forma diferente ou não glicadas) eventualmente presentes na amostra biológica analisada e, em particular, de outras frações menores, por exemplo da HbA_{1a} e da HbA_{1b}.

[045] De acordo com um modo de realização particular, o método analítico da presente invenção permite separar a hemoglobina S_{1c} e/ou a hemoglobina C_{1c}, das outras hemoglobinas (glicadas de forma diferente ou não glicadas) eventualmente presentes na amostra biológica analisada.

[046] Por "composição tampão" entende-se uma composição, em particular uma solução, que conserva aproximadamente o mesmo pH, apesar da adição de pequenas quantidades de ácido ou de uma base, ou a despeito de uma diluição.

[047] O termo "complexar" ou "complexação" é usado no presente pedido para significar que uma associação (química ou meramente física) ocorre entre duas entidades, em particular entre duas moléculas (por exemplo, uma molécula pequena e uma macromolécula) através dos grupos funcionais.

[048] Em um modo de realização preferido, uma dessas duas entidades (o composto capaz de complexar resíduos de glicose) é associada com (por exemplo, reage com um grupo cis-diol), em particular com dois grupos hidroxila vicinais, de um resíduo de glicose da outra entidade (uma hemoglobina glicada).

[049] Como mostrado na parte "exemplos", complexar especificamente o(s) resíduo(s) de glicose de uma ou mais hemoglobina(s) glicada(s) e fornecer-lhes cargas negativas em pH alcalino significa, no presente pedido, que o composto usado na presente invenção permite deslocar o pico de migração eletroforética que corresponde a uma hemoglobina glicada em posição N-terminal por glicose, fora da área de migração eletroforética que corresponde à hemoglobina glicadas em posição N-terminal por outro açúcar (por exemplo, a glicose-6-fosfato, frutose 1-6 difosfato, ou piruvato), e de preferência fora da zona dos picos de migração eletroforética que corresponde às outras hemoglobinas da amostra. Assim, as frações menores que não contêm um resíduo de glicose ligado à cadeias do aminoácido N-terminal das cadeias beta, em particular as frações A_{1a} e A_{1b}, não interferem com a análise da HbA_{1c} de acordo com método da presente invenção.

[050] A título de exemplo, a capacidade de um composto de complexar especificamente resíduos de glicose de uma ou mais hemoglobina(s)

glicada(s) e de fornecer cargas negativas em pH alcalino, no sentido da presente invenção pode ser constatada pelo seguinte teste: uma amostra de referência (por exemplo, "mistura HbA_{1a}, HbA_{1b} ", "A_{1c}" e "A₀" da Exocell, Reino Unido), contendo diferentes frações de hemoglobina glicada purificadas e em particular as frações A₀ e A_{1c} ou as frações A₀, A_{1b} e A_{1a} é introduzida em uma eletroforese capilar que contém a seguinte composição tampão: 200mM de CHES, 20mM de putrescina, entre 10 e 120 mM (por exemplo, 50mM ou 30 mM) do composto a ser testado, se necessário, 2,5 g/l de cloreto de sódio, água, e, se necessário, uma base para ajustar o pH para um valor superior a 9, por exemplo 9,4. Uma eletroforese capilar em solução livre capilar em capilar nu é então realizada, por exemplo em um aparelho Capillarys® (Sebia), com um comprimento de onda de 415 nm. Em seguida, foi estudado o perfil eletroforético obtido; se a separação for perfeita HbA_{1c} entre o pico correspondente a HbA₀ (ou em função do tipo de amostra usado, entre o pico correspondente a HbA_{1c} e os picos correspondentes a HbA₀, HbA_{1b} e bA_{1a}), nesse caso o composto testado é considerado como capaz de complexar especificamente resíduos de glicose e de fornecer cargas negativas em pH alcalino no sentido da presente invenção. Inversamente, se o pico que corresponde à HbA_{1c} e o que corresponde a HbA_{1b} (ou, em função do tipo de amostra utilizada, o pico correspondente à HbA_{1c}, ou o que corresponde a HbA₀, HbA_{1b} ou HbA_{1a}) se sobrepuser ou se acavalem, nesse caso o composto de teste não é considerado adequado para implementar a presente invenção.

[051] A concentração do composto a ser testado é dada apenas a título indicativo no teste indicado acima, se uma concentração de 10 a 120 mM de composto a ser testado não permitir obter uma separação suficiente entre o pico que corresponde ao HbA_{1c} e o pico que corresponde a outras hemoglobinas da amostra no teste indicado acima, é possível sair dessa faixa de concentração a fim de obter uma separação ótima do pico correspondente à HbA_{1c}.

[052] Qualquer composto químico (isto é, geralmente uma molécula orgânica), qualquer anticorpo, polipeptídeo, peptídeo ou qualquer outro composto capaz de complexar especificamente resíduos de glicose e fornecer cargas negativas em pH alcalino, no sentido da presente invenção pode ser usado na presente invenção. Um anticorpo apropriado pode ser gerado por qualquer método conhecido do técnico no assunto e pode ser, por exemplo, um anticorpo policlonal ou monoclonal, um anticorpo quimérico, um fragmento de anticorpo, por exemplo um fragmento Fab.

[053] Como ilustrado na parte "exemplos", o ácido bórico não é um composto químico capaz de complexar especificamente resíduos de glicose e fornecer cargas negativas em pH alcalino, no sentido da presente invenção, pois ele não permite realizar uma análise confiável e, em particular, uma dosagem confiável de hemoglobinas glicadas e em particular da HbA_{1c}. Exemplos de compostos químicos apropriados são estão definidos mais precisamente a seguir.

[054] Cada resíduo de glicose complexada com o composto capaz de complexar especificamente resíduos de glicose interage com uma molécula de composto diferente.

[055] De acordo com um modo de realização particular, quando ele estiver presente em quantidade suficiente na composição tampão da presente invenção, o referido composto é capaz de complexar especificamente o(s) resíduo(s) de glicose N-terminais de uma hemoglobina glicada, isto é, de complexar especificamente, para cada cadeia de globina (em particular beta) que compreende um resíduo de glicose ligado ao aminoácido localizado em posição N-terminal, o referido resíduo de resíduo. O referido composto é assim capaz de complexar especificamente cada resíduo de glicose ligado à valina em posição N-terminal nas cadeias beta da hemoglobina A_{1c} ou ainda de uma hemoglobina ou S_{1c} ou C_{1c}.

[056] De acordo com um modo de realização particular, o referido composto é capaz, quando estiver presente em quantidade suficiente na composição tampão da presente invenção, de complexar especificamente todos os resíduos de glicose das hemoglobinas glicadas em posição N-terminal de glicose.

[057] De acordo com um modo de realização particular, o referido composto é capaz, quando estiver presente em quantidade suficiente na composição tampão da presente invenção, de complexar especificamente todos os resíduos de glicose de uma hemoglobina, qualquer que seja sua posição sobre a(s) cadeia(s) de globina. Assim, quando o referido composto está presente em quantidade suficiente na composição tampão da presente invenção, uma molécula de hemoglobina com um número x de resíduos de glicose pode fixar um número x de moléculas do referido composto.

[058] Ao se complexar especificamente com um ou mais resíduos de glicose de hemoglobinas glicadas de uma amostra biológica, o referido composto confere a essa ou essas hemoglobina(s) glicada(s) várias cargas elétricas negativas em pH alcalino, ou seja, permite sobrecarregar essa(s) hemoglobina(s) glicada(s) com cargas elétricas negativas em pH alcalino.

[059] O referido composto fornece várias cargas elétricas negativas em pH alcalino a cada resíduo de glicose assim complexado uma mesma hemoglobina. Devido a esse aporte de cargas elétricas negativas em pH alcalino, a hemoglobina que compreende pelo menos um resíduo de glicose tem sua mobilidade eletroforética modificada sob o efeito de sua complexação com o referido composto. Isso se manifesta, em um perfil eletroforético, pelo deslocamento do ou dos picos de eletroforese que correspondem às hemoglobinas glicadas com um ou mais resíduo(s) de glicose que estão presentes na amostra biológica analisada.

[060] Todas as hemoglobinas que compreendem pelo menos um

resíduo de glicose que estão presentes amostra biológica formam um complexo com o composto que complexa a glicose e que confere cargas elétricas negativas em pH alcalino (desde que, evidentemente, que o referido composto esteja presente em quantidade suficiente para complexar cada uma dessas hemoglobinas). Entretanto, as diferentes hemoglobinas e em particular as diferentes hemoglobinas que compreendem pelo menos um resíduo de glicose na origem um ponto diferente isoelétrico (devido à natureza de suas cadeias de globina, o número e a posição dos ou resíduo(s) de glicose nessas cadeias de globina e o número, a natureza e a posição dos outros açúcares eventualmente ligados nessas hemoglobinas). Considerando as cargas elétricas negativas em pH alcalinas fornecida pela complexação de cada resíduo de glicose com o referido composto, a diferença de carga entre essas diferentes hemoglobinas é ainda mais pronunciada quando elas estão em forma complexada com o referido composto.

[061] As hemoglobinas glicadas que compreendem um resíduo de glicose ligado ao aminoácido que se encontra em posição N-terminal em pelo menos uma de suas cadeias de globina (em particular nas cadeias beta) possuem por causa disso pelo menos uma glicose a mais que as outras hemoglobinas (glicadas de forma diferente ou não glicadas). Em particular, a hemoglobina A_{1c} possui nas cadeias beta pelo menos uma glicose a mais do que outras frações menores da hemoglobina A₁. Conseqüentemente, quando são complexadas de acordo com a presente invenção, essas hemoglobinas glicadas em posição N-terminal são carregadas mais fortemente com cargas elétricas negativas em pH alcalino pelo referido composto que as outras hemoglobinas (as hemoglobinas glicadas que não compreendem um resíduo de glicose ligado ao amino ácido N-terminal das cadeias de globina ou as hemoglobinas não-glicadas).

[062] Ao aumentar assim a diferença de mobilidade eletroforética

existente entre as diferentes hemoglobinas que compreendem glicose e/ou entre uma ou mais hemoglobina(s) que compreendem glicose e as outras hemoglobinas presentes na amostra biológica analisada, obtém-se uma melhor separação entre uma ou mais hemoglobina(s) glicada(s) em posição N-terminal e a(s) outra(s) hemoglobina(s) eventualmente presente(s) na referida amostra, particularmente entre a hemoglobina A_{1c} e as outras frações menores da hemoglobina A₁, eventualmente presentes na referida amostra.

[063] Assim, o método da presente permite separar eficazmente hemoglobinas glicadas em posição N-terminal, e em particular a HbA_{1c}, das outras hemoglobinas e das outras frações menores presentes em uma amostra biológica que contém outras hemoglobinas. Além disso, interferentes clássicos tais como as formas lábeis, acetiladas ou carbamiladas não interferem com a dosagem da HbA_{1c} da presente invenção. O método da presente invenção permite em particular, evitar as interferências que possam resultar, na ausência de cargas elétricas negativas em pH alcalino adicionadas pela complexação, da co-migração de hemoglobina A_{1c} e das outras frações menores da hemoglobina A₁ (como HbA_{1a} e HbA_{1b}) presentes na amostra biológica, na etapa de separação eletroforética.

[064] A ou as hemoglobina(s) glicada(s) em posição N-terminal assim separada(s) pode(m) em seguida ser dosada(s), em presença de outras ou das outras hemoglobinas eventualmente presentes na amostra biológica analisada. Pode-se portanto dosar, por exemplo, a THbA_{1c} na presença de outras frações menores da hemoglobina A₁ e, em particular, na presença de HbA_{1a} e/ou HbA_{1b}, sem que essas outras frações menores presentes na amostra biológica analisada interfiram com essa dosagem.

[065] O termo "dosar" ou "dosagem" significa, no presente pedido, determinar a quantidade da hemoglobina ou das hemoglobinas de interesse em

presença eventualmente de uma ou mais outra(s) hemoglobina(s) da amostra biológica analisada e/ou a proporção da referida ou das referidas hemoglobina(s) de interesse em relação à quantidade total de hemoglobina ou em relação à quantidade de certas hemoglobinas presentes na referida amostra.

[066] A dosagem realizada na presente invenção pode ser semiquantitativa; é medida então a porcentagem de uma hemoglobina dada em relação à quantidade de outra hemoglobina ou de outra(s) hemoglobina(s) presente(s) na referida amostra. Assim, no caso da HbA_{1c}, é medida então geralmente a porcentagem de HbA_{1c} em relação à quantidade de outra(s) hemoglobina(s); a área do pico eletroforético que corresponde à HbA_{1c} é em geral dividida pela área do pico que corresponde à HbA₀ ou então pela soma (área do pico que corresponde a HbA_{1c} + a área do pico que corresponde a HbA₀) pela soma (área de todos os picos de HbA) ou então pela soma (área do pico que corresponde à HbA_{1c} + área do pico que corresponde à HbA₀ + área do pico que corresponde à HbA₂), ou ainda superfície total do perfil eletroforético.

[067] Pode também se tratar de uma dosagem quantitativa; os resultados são então expressos em milimols (mmol) de uma hemoglobina dada por mol de outra hemoglobina ou de outra(s) hemoglobina(s) presente(s) na referida amostra, por exemplo, em mmols de HbA_{1c} por mol de HbA.

[068] Em um modo particular da presente invenção, o composto que complexa especificamente resíduos de glicose de hemoglobinas glicadas e que conferem a essas hemoglobinas glicadas cargas negativas em pH alcalino compreende vários grupos funcionais, em particular dois ou mais de dois grupos funcionais.

[069] Pelo menos um desses grupos funcionais complexa especificamente um resíduo de glicose (particularmente um resíduo de glicose ligado ao aminoácido que se encontra em posição N-terminal de uma cadeia de globina) interagindo, por exemplo, com um grupo cis-diol, em particular com dois

grupos hidroxila vicinais de um resíduo de glicose. A título de exemplo, esse(s) grupo(s) pode(m) ser um grupo boronato, em particular um grupo boronato tal como definido no presente pedido.

[070] Esse(s) grupo(s) que complexam a glicose, pode(m) fornecer uma carga elétrica negativa em pH alcalino por resíduo de glicose complexado, ou seja, uma ou mais carga(s) negativa(s) em pH alcalino por molécula de hemoglobina complexado (uma carga negativa, se a molécula de hemoglobina compreender apenas um resíduo de glicose e n cargas negativas se a molécula de hemoglobina compreender n resíduos de glicose).

[071] O outro, um dos outros, ou os outros(s) grupo(s) funcional(ais) do referido composto (isto é, o(s) grupo(s) funcional(ais) que não complexam a glicose) fornecem por sua vez uma ou mais carga(s) elétrica(s) negativa(s) em pH alcalino para cada resíduo de glicose complexada com uma molécula da referida hemoglobina.

[072] Assim, nesse modo de realização particular da presente invenção, cada molécula de composto que complexa especificamente resíduos de glicose da presente invenção compreende pelo menos um grupo funcional capaz de complexar um resíduo de glicose de uma hemoglobina glicada (e em particular um resíduo de glicose N-terminal de uma hemoglobina glicada em posição N-terminal) e pelo menos um grupo funcional que não complexa a glicose, mas permite sobrecarregar essa hemoglobina glicada com cargas negativas em pH alcalino, pois ele fornece uma ou mais carga(s) negativa(s) adicional(ais) em pH alcalino a essa hemoglobina glicada. O grupo funcional capaz de complexar a glicose pode igualmente fornecer uma carga elétrica negativa em pH alcalino.

[073] De acordo um modo de realização particular da presente invenção, o composto que complexa especificamente resíduos de glicose e que fornece cargas negativas em pH alcalino (mais precisamente, cada molécula

desse composto) fornece, para cada resíduo de glicose complexado, várias cargas negativas em pH alcalino a uma molécula de hemoglobina glicada, e em particular a uma hemoglobina glicada em posição N-terminal. De preferência, ele fornece para cada resíduo de glicose complexado, pelo menos duas (em particular duas, três, quatro, cinco ou seis) cargas elétricas negativas em pH alcalino a uma molécula de hemoglobina glicada.

[074] De acordo com um modo de realização particular da presente invenção, o grupo funcional, ou pelo menos um dos grupos funcionais que complexam especificamente resíduos de glicose é negativamente carregado em pH alcalino.

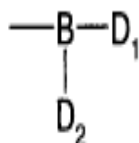
[075] De acordo com um modo particular da presente invenção, o composto capaz de complexar especificamente resíduos de glicose de hemoglobinas glicadas e fornecer-lhes cargas negativas em pH alcalino compreende um ou mais grupos ionizáveis (em particular anionizáveis) em pH alcalino. Estes grupos ionizáveis podem ser de diferentes tipos. Por exemplo, o composto pode conter um ou mais carboxilato(s), carboxila(s), sulfonato(s) e/ou sulfonila(s). O referido composto pode ser em particular um ácido policarboxílico, especialmente um ácido dicarboxílico ou ácido tricarboxílico. O referido composto também pode igualmente ser um ácido polissulfônico, em particular um ácido dissulfônico ou trissulfônico.

[076] Em um modo de realização particular da presente invenção, o grupo, um dos grupos ou os grupos que fornecem uma ou mais carga(s) elétrica(s) negativa(s) em pH alcalino para cada resíduo de glicose complexado de uma molécula de hemoglobina glicada compreende(m) um ou mais grupo(s) ionizável(eis) em pH alcalino tais como definidos no presente pedido, em particular um ou mais (em particular dois ou três) grupo(s) carboxilato, carboxila, sulfonato e/ou sulfonila.

[077] De acordo com um modo de realização particular da

presente invenção, o grupo, um dos grupos ou os grupos que complexam especificamente resíduos de glicose compreende(m) ou consiste(em) um ou mais grupo(s) boronato.

[078] Por "grupo boronato" entende-se, no presente pedido, um grupo de fórmula:



no qual D₁ e D₂ são escolhidos independentemente um do outro, entre um grupo hidroxila e um grupo suscetível ser hidrolisado para dar um grupo hidroxila em solução aquosa, em particular a um pH alcalino.

[079] Em um modo particular de realização da presente invenção, o referido grupo boronato que é o grupo -B(OH)₂, (também denominado grupo boronila) ou uma forma ionizada, em particular -B(OH)₃⁻.

[080] Em um modo de realização particular da presente invenção, o composto capaz de complexar especificamente resíduos de glicose de hemoglobinas glicadas e fornecer-lhes cargas negativas em pH alcalino é

(i) um composto boronato de fórmula geral RB(OH)₂ (também composto também denominado ácido borônico), ou de fórmula geral RB(OH)₃⁻, cujo grupo R compreende pelo menos uma arila e/ou uma alquila (linear, ramificada ou cíclica) e/ou uma aralquila e/ou uma combinação delas, e o referido grupo R fornece uma ou mais carga(s) elétrica(s) negativa(s) em pH alcalino para cada resíduo de glicose complexado como grupo boronato, ou

(ii) um sal desse composto boronato.

[081] Assim, em pH alcalino, além da carga elétrica negativa em pH alcalino, fornecida pelo grupo boronila ou boronato dos compostos boronato ou de seu sal, o grupo R fornece uma ou mais carga(s) elétrica(s) negativa(s)

adicional(ais) para cada resíduo de glicose complexado com o grupo boronila ou boronato.

[082] Por "composto de fórmula geral $RB(OH)_2$ " entende-se igualmente, no sentido do presente pedido, qualquer forma iônica em equilíbrio com ela, em particular $RB(OH)_3$, ou qualquer outra forma suscetível de estar em equilíbrio com ela, em função das condições do meio.

[083] Um "sal", no sentido do presente pedido designa qualquer sal, e em particular um sal de sódio, de lítio ou de potássio.

[084] O grupo R do composto boronato da presente invenção pode também incluir outras funções e/ou heteroátomos, além da ou das funções arila, alquila, aralquila ou uma de suas combinações.

[085] Em um modo de realização particular, o grupo R fornece, duas ou mais de duas (de preferência duas), cargas elétricas negativas em pH alcalino para cada resíduo de glicose complexado com o grupo boronila ou boronato do composto boronato da presente invenção ou de seu sal.

[086] Em um modo de realização particular, o grupo R consiste de uma ou mais arila(s), alquila(s) (linear(es), ramificada(s) ou cíclica(s)) e/ou aralquila(s) e/ou uma combinação delas.

[087] De acordo um modo de realização particular, a ou as arila(s), alquila(s), aralquila(s) ou outros grupos funcionais e/ou heteroátomos ou suas combinações presente(s) no grupo R do composto boronato da presente invenção pode(m) ser substituído(s).

[088] O termo "substituído", tal como usado no presente pedido pode significar monossubstituído ou, ao contrário, polissubstituído, em particular, di-, tri-, tetra-, penta ou hexa-substituído.

[089] Os substituintes podem ser em particular grupos ionizáveis (em particular anionizáveis) em pH alcalino, tal como definidos no presente pedido. O grupo R pode também incluir um ou mais heteroátomos, ou outros

grupos funcionais.

[090] De acordo um modo particular da presente invenção, o grupo R do composto boronato fornece, para cada resíduo de glicose complexado, uma ou mais carga(s) elétrica(s) negativa(s) em pH alcalino a uma molécula de hemoglobina glicada. De preferência, ele fornece para cada resíduo de glicose complexado, uma, duas, três ou quatro cargas elétricas negativas em pH alcalino a uma molécula de hemoglobina glicada.

[091] Um composto boronato tal como definido acima inclui principalmente ácidos borônicos e, em particular, ácidos fenilborônicos.

[092] De acordo com um modo particular da presente invenção, o composto capaz de complexar especificamente resíduos de glicose de hemoglobinas glicadas e fornecer-lhes cargas negativas em pH alcalino é um fenilboronato polissubstituído, em particular um fenilboronato dissustituído, por exemplo por grupos carboxila(s) e/ou sulfonila(s).

[093] De acordo com um modo de realização particular da presente invenção, o grupo R do composto boronato ou de seu sal é um ácido dibásico, em particular um ácido dicarboxílico. De acordo com um modo de realização particular da presente invenção, o composto boronato é um ácido dicarboxifenilborônico, de preferência escolhido entre o ácido 3,5-dicarboxifenilborônico e 3,4-dicarboxifenilborônico.

[094] Assim, a título de exemplo, pode ser usado, como um composto boronato, 3,5-dicarboxifenilborônico (3,5 dCPBA). Esse composto está disponível comercialmente em particular junto à Combi-blocks Inc. (San Diego, Estados Unidos), com o nome comercial ácido 3,5-dicarboxifenilborônico e junto a Apollo Scientific Ltd. (Cheshire, Reino Unido), com o nome comercial ácido 3,5- dicarboxifenilborônico.

[095] Na composição tampão da presente invenção, a concentração de composto capaz de complexar especificamente resíduos de

glicose de hemoglobinas glicadas e fornecer-lhes cargas negativas em pH alcalino está geralmente em excesso estequiométrico em relação à quantidade total de proteínas, em particular em relação à quantidade total de todas as hemoglobinas presentes na amostra biológica ou em relação à quantidade total de todas as hemoglobinas que compreendem glicose presentes na amostra biológica. Assim, a quantidade desse composto na composição tampão é superior à quantidade necessária para que todos os resíduos de glicose das hemoglobinas presentes na amostra sejam complexados pelo referido composto quando uma amostra é diluída ou uma parte dessa amostra na composição tampão. Assim, para cada molécula de hemoglobina glicada que compreende glicose presente na amostra biológica analisada, existem pelo menos tantas moléculas desse composto na composição tampão quantos resíduos de glicose presentes nessa molécula de hemoglobina glicada. Isso permite obter uma separação completa da hemoglobina glicada ou das hemoglobinas glicadas de interesse das outras hemoglobinas também presentes na amostra biológica analisada.

[096] De acordo com um modo particular de realização da presente invenção, na composição tampão da presente invenção, a concentração de composto capaz de complexar especificamente resíduos de glicose de hemoglobinas glicadas e fornecer-lhes cargas negativas em pH alcalino está compreendida entre 0,10 e 100 mM, de preferência entre 10 e 60mM, e mais preferencialmente entre 20 e 50 mm, por exemplo, 30 mm ou 50mM.

[097] A expressão "compreendido(a) entre x e y" significa, no presente pedido, que as extremidades x e y estão incluídas no intervalo de valor x-y indicado.

[098] Em um modo de realização particular, a composição tampão da presente invenção compreende ainda:

- um composto tampão que possui um pKa compreendido entre 8,0 e 11,0,

- e/ou um retardador de fluxo, e/ou

- uma base; e/ou

- um sal e/ou

- uma solução de diluição apropriada, por exemplo água.

[099] Assim, a composição tampão da presente invenção compreende ou consiste de (i) um composto capaz de complexar especificamente resíduos de glicose de hemoglobinas glicadas e fornecer-lhes cargas negativas em pH alcalino, e (ii) um ou mais e em particular todos os compostos escolhidos a entre: um composto tampão que possui um pKa compreendido entre 8,0 e 11,0, um retardador de fluxo, uma base (em particular um sal de sódio (por exemplo, cloreto de sódio)), uma solução de diluição apropriada (por exemplo, água) e suas misturas.

[0100] O composto tampão é de preferência um composto zwitteriônico. Ele em particular ser escolhido entre AGP, AMPD, AMPSO, bicina, CABS, CAPS, CAPSO CHES, HEPBS, metilamina, TABS, TAPS, taurina, e tricina e tris; em particular, são escolhidos de preferência CAPS, CAPSO ou CHES, de preferência CHES. Esses compostos possui uma grande capacidade de tampão nos pH alvo (pH 8-11) e são particularmente apropriados para obter uma boa focalização das hemoglobinas.

[0101] A concentração do composto tampão na composição tampão da presente invenção está geralmente compreendida entre 20 e 500 mM, de preferência entre 50 e 400 mM, mais preferencialmente entre 100 e 350 mM, ou entre 150 e 300 mM, por exemplo, cerca de 200 mM ou cerca de 300 mM.

[0102] O retardador de fluxo destina-se a aumentar o efeito das diferenças de carga elétrica a fim de obter uma boa resolução de separação entre as diferentes hemoglobinas. Esse tipo de composto age diminuindo o

fluxo eletro-osmótico, o que retarda a migração de diferentes frações e permite aumentar sua separação. O retardador de fluxo utilizado pode ser uma diamina alifática, em particular uma diamina alifática escolhida entre 1,3-diaminopropano, 1,4-diaminobutano (putrescina), 1,5-diaminopentano (cadaverina), 1,6-diaminohexano, a espermina e a DETA, ou um derivado do diamina alifática ou uma de suas misturas.

[0103] Por "derivativo", entende-se em particular aqui uma poliamina alifática, uma poliamina, um sal (por exemplo, sal de sódio) ou uma mistura de suas misturas.

[0104] De acordo com um modo de realização particular da presente invenção, o retardador de fluxo é escolhido entre a putrescina, seus derivados e suas misturas.

[0105] De acordo com um modo de realização particular da presente invenção, o retardador de fluxo é a putrescina. Em particular, a putrescina está forma pura, com, se necessário, a adição de sal (em particular um sal de sódio, por exemplo, cloreto de sódio).

[0106] De acordo com outro modo de realização particular da presente invenção, o retardador de fluxo é o cloridrato de putrescina (ou putrescina 2HCl).

[0107] Na composição tampão da presente invenção, a concentração do retardador de fluxo está vantajosamente compreendida entre 0,10 e 40 mM, de preferência entre 10 e 30 mM e mais preferencialmente entre 15 e 25 mM, por exemplo, 20 mM.

[0108] A base eventualmente adicionada à composição tampão permite ajustar o pH da referida composição. É possível usar uma base pertencente à família dos hidróxidos, em particular uma base escolhida entre o hidróxido de lítio, o hidróxido de sódio, o hidróxido de potássio, o hidróxido de rubídio, o hidróxido de célio, o hidróxido de frâncio, um hidróxido de

mono-, di-, tri- ou tetra alquil amônio e suas misturas.

[0109] De acordo um modo de realização particular da presente invenção, a base eventualmente adicionada à composição tampão é hidróxido de sódio.

[0110] Vantajosamente, uma quantidade suficiente base é adicionada à composição tampão para que seu pH seja superior ou igual a 9,0, de preferência compreendido entre 9,0 e 11,0 e mais preferencialmente compreendido entre 9,0 e 10,0, por exemplo compreendido entre 9,3 e 9,5, e mais preferencialmente ainda um pH de 9,4 ou 9,5. Um pH alcalino superior a 9 permite obter frações de hemoglobina carregadas negativamente (sendo que o ponto isoelétrico das hemoglobinas está compreendido entre 6,05 e 7,63).

[0111] De acordo com um modo de realização particular da presente invenção, o sal eventualmente presente na composição tampão da presente invenção é um sal de sódio, de preferência o cloreto de sódio. A composição tampão pode compreender, por exemplo, 2,5 g/l de cloreto de sódio.

[0112] De acordo um modo de realização particular da presente invenção, quando a composição tampão compreender putrescina, em particular putrescina pura, ela compreende igualmente um sal (em particular, um sal de sódio), de preferência cloreto de sódio, por exemplo, 2,5 g/l de cloreto de sódio.

[0113] De acordo com outro modo de realização particular da presente invenção, a composição tampão compreende cloridrato de putrescina, não compreende cloreto de sódio, e de preferência não compreende nenhum sal.

[0114] De acordo com um modo de realização particular da presente invenção, a composição tampão compreende ou consiste de:

- 200mM de CAPSO;
- 10 mM de putrescina (por exemplo, putrescina 2HCl, ou putrescina pura e cloreto de sódio);

- 50mM de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico;
- água, e
- se necessário, uma base, por exemplo, a soda, para ajustar o pH, por exemplo a um valor superior a 9 ou 10 e, de preferência a um valor de 10,2; ou, mais preferencialmente, de:
 - 200mM de CAPSO;
 - 15 mM de putrescina (por exemplo, putrescina 2HCl, ou putrescina pura e cloreto de sódio);
 - 100mM de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico;
 - água, e
 - se necessário, uma base, por exemplo a soda, para ajustar o pH, por exemplo a um valor superior a 9 ou 10 e, de preferência a um valor de 10,2; ou, mais preferencialmente ainda, de:
 - 200mM de CHES;
 - 20mM putrescina (por exemplo, a putrescina 2HCl ou putrescina pura e cloreto de sódio);
 - 30mM de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico;
 - água, e
 - se necessário, uma base, por exemplo, a soda, para ajustar o pH, por exemplo a um valor superior a 9, e de preferência a um valor de 9,4.

[0115] De acordo com um modo de realização particular da presente invenção, a composição tampão compreende ou consiste dos constituintes indicados acima, nas concentrações indicadas acima, e um ou mais sais, em particular cloreto de sódio, por exemplo, 2,5 g/l de cloreto de sódio.

[0116] Como ilustrado na parte exemplo, essas composições tampão permitem obter uma separação perfeita de hemoglobina HbA_{1c} das outras hemoglobinas presentes na amostra biológica analisada, bem como uma separação entre elas das diferentes frações menores (incluindo HbA_{1a}, HbA_{1b} e

HbA_{1c}) sem paralelo no campo da eletroforese capilar em solução livre.

[0117] O termo "amostra biológica" designa, no presente pedido, qualquer fluido biológico que compreende glóbulos vermelhos. O referido fluido biológico pode provenir de um paciente humano sadio ou doente (por exemplo, um paciente diabético) ou ser de origem animal, em particular provir de um mamífero não humano (sadio ou doente). O referido fluido biológico (humano ou mamífero não humano) pode ser, por exemplo, sangue, em particular sangue arterial normal ou não, lavado, decantado, centrifugado, hemolisado ou total. As amostras biológicas podem também ser de origem sintética ou purificada.

[0118] A presente invenção é particularmente útil para a análise de amostras de sangue, em particular para a análise de uma amostra de sangue proveniente um paciente diabético ou de um mamífero não humano diabético.

[0119] De acordo com um modo de realização particular, a referida amostra biológica compreende ou consiste de várias hemoglobinas, em particular várias hemoglobinas glicadas que compreendem um resíduo de glicose ligado a aminoácido que se encontra em posição N-terminal em pelo menos uma cadeia de globina (por exemplo, cadeias beta), e particularmente de hemoglobina A_{1c}.

[0120] A amostra biológica utilizada pode ser diluída antes da análise por eletroforese capilar com uma solução de diluição apropriada, por exemplo, uma solução hemolisante e/ou uma solução de tampão de análise, em particular a composição tampão da presente invenção. A análise é de preferência realizada a partir de uma amostra de sangue hemolisada.

[0121] De acordo com outro modo de realização particular, a amostra biológica é diluída, em um primeiro tempo, em uma solução hemolisante, e em seguida na composição tampão da presente invenção.

[0122] O termo "solução hemolisante" designa, no presente pedido, uma solução capaz de provocar a hemólise dos glóbulos vermelhos, ou seja, a

destruição dos glóbulos, e de hemoglobina. Ela pode permitir, dependendo da sua composição, uma lise total dos glóbulos vermelhos, usando eventualmente um movimento fraco mecânico adicional (vórtex, agitação,...). A solução hemolisante pode compreender aditivos usuais de lise celular, por exemplo, o Triton X100, que é comumente usado em uma concentração de 1 g/l. A solução hemolisante pode ainda opcionalmente compreender um composto capaz de complexar especificamente resíduos de glicose de hemoglobinas glicadas e fornecer-lhes cargas negativas em pH alcalino, tal como definido no presente pedido.

[0123] A título de exemplo, a solução hemolisante pode ser escolhida no grupo constituído pela solução hemolisante Capillarys® Hemoglobin(e) da Sebia, a solução hemolisante MINICAP® hemoglobin(e) da sebia, a solução hemolisante HydraGel® HbA_{1c} da Sebia, a água puro, água com adição de tensoativo, em particular a água com adição de Triton X100 (por exemplo 1 g/l de Triton X100) e suas misturas.

[0124] De acordo um modo de realização particular, o método de análise por eletroforese capilar da presente invenção compreende as seguintes etapas:

(a) a introdução em um capilar de eletroforese, da composição tampão da presente invenção e da amostra biológica; e

(b) a separação dos componentes da referida amostra biológica por eletroforese capilar.

[0125] Essas duas etapas são geralmente antecedidas por uma etapa de diluição da amostra biológica, por exemplo, em uma solução hemolisante. Essa etapa de diluição pode ser realizada em particular no suporte de amostras, por exemplo, em um equipamento Capillarys® (Sebia) ou na cúpula MINICAP® (Sebia).

[0126] Na etapa (a), a composição tampão da presente invenção e

a amostra biológica podem ser introduzidas separadamente (simultaneamente ou não) em um mesmo capilar de eletroforese, e a mistura é então realizada no capilar. Pode-se, por exemplo, introduzir, no capilar de eletroforese, primeiramente a composição tampão da presente invenção, e em seguida a amostra.

[0127] De modo alternativo, a amostra biológica pode ser introduzida em um capilar de eletroforese na etapa (a) na forma de uma mistura com a composição tampão da presente invenção.

[0128] Dependendo do tipo de aparelho de eletroforese capilar utilizado e em função do número de análises a serem realizadas, é utilizado um único capilar ou vários capilares em paralelo. Quando se dispõe de um único capilar, esse capilar é geralmente utilizado várias vezes sucessivamente, de modo a poder realizar várias análises. Evidentemente, quando vários capilares são utilizados, pode-se, se necessário, realizar várias migrações eletroforéticas sucessivas, durante as quais vários capilares são usados em paralelo.

[0129] A etapa de separação dos constituintes da amostra biológica por eletroforese capilar consiste em particular em aplicar ao(s) capilar(es) um campo elétrico de voltagem suficiente para permitir a separação de uma ou mais hemoglobina(s) glicada(s) de interesse das outras proteínas, e em particular das outras hemoglobinas que podem estar presentes na amostra biológica.

[0130] As condições de realização da eletroforese capilar em veia líquida são as condições habitualmente implementadas pelo técnico no assunto para as etapas de introdução da amostra e da composição tampão no ou nos capilar(es) e de separação dos constituintes da amostra por migração eletroforética. O campo elétrico aplicado pode ser, por exemplo, de cerca de 400 V/cm. Elas podem compreender usualmente uma lavagem dos capilares com uma solução de lavagem, uma lavagem com a composição tampão utilizada para

a análise, ou uma mais diluição(ões) eventual(ais) da amostra, a introdução da amostra no ou nos capilar(es), a migração e a detecção. Essas etapas podem ser realizadas por autômatos.

[0131] Condições de realização de uma eletroforese capilar são, por exemplo, as condições apropriadas para usar o autômato Capillarys® da Sebia ou MINICAP® da Sebia.

[0132] A etapa de separação dos constituintes da amostra biológica é geralmente seguida de uma etapa de detecção de uma ou mais proteína(s), em particular de uma ou mais hemoglobina(s) presente(s) na amostra biológica, e mais particularmente uma ou mais hemoglobina(s) glicada(s) de interesse presente(s) na amostra biológica, por exemplo, a hemoglobina A_{1c}.

[0133] A etapa de detecção pode ser feita, em particular, através da medição da absorvência, incluindo, por exemplo, a um comprimento de onda de cerca de 415 nm, específico da hemoglobina; as hemoglobinas podem ser analisadas a um comprimento de onda de aproximadamente 200 nm, mas para evitar interferências com em particular às proteínas plasmáticas, que são de preferência analisadas a um comprimento de onda de 415 nm.

[0134] No contexto de realização da presente invenção, a apresentação dos resultados da separação eletroforética pode ser feita do modo ilustrado nos exemplos, na forma de perfis eletroforéticos gerados a partir de um sinal de detecção proporcional à quantidade de hemoglobina detectada. Assim, o método da presente invenção compreende geralmente ainda uma etapa de geração de um eletroforegrama a partir do sinal de detecção.

[0135] Tal como indicado acima, quando estiver presente na amostra biológica analisada, uma hemoglobina de interesse pode ser quantificada. Para isso, determina-se a superfície do pico que corresponde à referida hemoglobina.

[0136] Assim, o referido método compreende geralmente uma

etapa de determinação, em particular a partir do eletroforegrama, da quantidade de uma ou mais hemoglobina(s) presente(s) na amostra biológica e/ou da proporção de um ou mais de hemoglobina(s) presente(s) na amostra biológica em relação à quantidade total de proteínas, à quantidade total de hemoglobina e/ou à quantidade de certas hemoglobinas (por exemplo, em relação à quantidade de HbA ou de HbAo) presentes na amostra biológica. Pode-se determinar, em particular, a proporção de hemoglobina glicada A_{1c}, S_{1c} e/ou C_{1c} presente na amostra biológica em relação à quantidade total de todas as hemoglobinas ou em relação à quantidade de certa(s) hemoglobina(s) presentes na amostra biológica, por exemplo, em relação à quantidade total de hemoglobina A, S e/ou C, respectivamente.

[0137] De acordo com um modo de realização particular da presente invenção, essa dosagem pode ser obtida diretamente a partir do perfil eletroforético.

[0138] De acordo com um modo de realização particular da presente invenção, o método de análise compreende ainda uma etapa de quantificação de uma ou mais hemoglobina(s) presente(s) na amostra biológica analisada em relação a um ou mais calibrador(es) padrão (por exemplo, uma ou mais amostras biológicas de referência); isso permite padronizar os resultados.

[0139] Assim, a fim de obter um nível de precisão elevado na dosagem, cada capilar é geralmente calibrado em cada partida do aparelho de eletroforese utilizando amostras biológicas de referência (por exemplo, amostras padrão contendo concentrações conhecidas de diferentes frações hemoglobina glicada natural e/ou sintéticas, e se necessário, purificadas). Por exemplo, para dosar a HbA_{1c}, são geralmente utilizados pelo menos dois calibradores, por exemplo, um primeiro calibrador que compreende uma forte concentração conhecida de HbA_{1c}, e um segundo calibrador que compreende uma concentração baixa conhecida de HbA_{1c}. É então medida, com cada capilar do

aparelho de eletroforese, a quantidade de HbA_{1c} presente em cada calibrador. Isso permite estabelecer, para cada capilar, uma camada de regressão (em pelo menos dois pontos), que permitirá a seguir padronizar as mensurações efetuadas com esses diferentes capilares. Isso permite também padronizar os resultados obtidos em relação a um método de referência, usando os valores HbA_{1c} determinados por esse método para os calibradores.

[0140] De acordo com um modo de realização particular da presente invenção, a eletroforese capilar realizada é do tipo eletroforese capilar em solução livre, em particular do tipo de eletroforese capilar em solução livre capilar(es) nu(s).

[0141] Do ponto de vista dos materiais utilizados para os capilares, eles são comuns em eletroforese capilar. O técnico no assunto saberá adaptar a natureza do capilar e seu tamanho às necessidades da análise.

[0142] Por exemplo, em um modo de realização particular, o ou os capilar(es) de eletroforese capilar é (são) de sílica fundida.

[0143] A presente invenção tem igualmente por objeto o uso do método de análise por eletroforese capilar, de acordo com a presente invenção para separar uma ou mais hemoglobina(s) glicada(s) que compreende(m) glicose e mais precisamente uma ou mais hemoglobina(s) glicada(s) que compreendem cada uma, em uma ou mais cadeia(s) de globina (por exemplo, em cadeias beta), um ou mais resíduo(s) de glicose ligado(s) ao aminoácido que se encontra em posição N-terminal, de outras proteínas, em particular, de pelo menos outra hemoglobina e de preferência das outras hemoglobinas presente(s) em uma amostra biológica e, se necessário, para dosar a referida ou as referidas hemoglobina(s) glicada(s).

[0144] A presente invenção tem também por objeto uma composição tampão apropriada para a análise por eletroforese capilar de uma amostra biológica que compreende hemoglobinas e em particular de uma ou

mais hemoglobina(s) glicada(s), e mais particularmente uma ou mais hemoglobina(s) glicada(s) que compreendem uma ou mais glicoses em uma ou mais cadeias de globina (por exemplo, nas cadeias beta). A referida composição tampão compreende pelo menos um composto capaz, de um lado, de complexar especificamente resíduos de glicose de hemoglobinas glicadas e, de outro lado, de fornecer à referida ou às referidas hemoglobina(s) várias cargas elétricas negativas em pH alcalino.

[0145] A referida composição tampão é em particular a que é usada para implementar o método de análise por eletroforese capilar de uma amostra biológica apresentado no presente pedido.

[0146] Em particular, de acordo com um modo de realização particular da presente invenção, a composição tampão compreende, a título de composto capaz de complexar especificamente resíduos de glicose e de fornecer cargas elétricas negativas em pH alcalino, um derivado borônico de ácido policarboxílico em particular um ácido dicarboxílico ou ácido tricarboxílico, por exemplo o ácido 3,5-dicarboxifenilborônico.

[0147] De acordo com outro modo de realização particular da presente invenção, a composição tampão compreende, além do composto capaz de complexar especificamente resíduos de glicose e de fornecer cargas elétricas negativas em pH alcalino

- um retardador de fluxo; e/ou
- um composto tampão que possui um pKa entre 8,0 e 11,0; e/ou
- uma base; e/ou
- um sal (em particular, um sal de sódio, por exemplo, cloreto de sódio) e/ou
- uma solução de diluição apropriada, por exemplo, água.

[0148] Esses diferentes componentes podem ser tais como definidos no presente pedido.

[0149] De acordo com um modo de realização particular da presente invenção, a composição tampão tem um pH superior ou igual a 9,0, de preferência um pH entre 9,0 e 11,0 e mais preferencialmente um pH compreendido entre 9,0 e 10,0, por exemplo, um pH compreendido entre 9,3 e 9,5, e mais preferencialmente ainda um pH de 9,4. Esse pH pode ser obtido em particular pelo fornecimento de uma quantidade suficiente de uma base tal como definida acima.

[0150] As composições tampão da presente invenção são preparadas de maneira usual para composições de tampão de análise, ou seja, por adição dos constituintes em forma líquida, sólida a ser diluída, a um suporte aceitável. De maneira usual, o suporte é a água, a água destilada ou desmineralizada.

[0151] A presente invenção trata ainda de um kit (ou kits) que compreende uma composição tampão da presente invenção e, quando necessário, uma bula de uso, para realizar a análise eletroforética. Em outras palavras, o kit da presente invenção pode compreender ou consistir de uma composição tampão da presente invenção e de um material de embalagem e, quando necessário, uma bula de uso.

[0152] Assim, o kit da presente invenção compreende, em particular, um composto capaz de complexar especificamente resíduos de glicose de hemoglobina glicada e de fornecer cargas negativas em pH alcalino, tal como definido no presente pedido. Quando o referido kit compreender, além desse composto, outros compostos, em particular um ou mais composto(s) escolhido(s) entre: um composto tampão que possui um pKa compreendido entre 8,0 e 11,0, um retardador de fluxo, uma base, um sal (em particular, um sal de sódio, por exemplo, cloreto de sódio), uma solução de diluição apropriada (por exemplo, água) e suas misturas, os diferentes componentes desse kit podem ser condicionados para serem

misturados extemporaneamente ou, ao contrário, serem embalados juntos, em particular em uma mesma composição na forma de uma mistura. De modo alternativo, certos compostos desse kit podem ser condicionados separadamente, ao passo que outros são condicionados juntos, em particular na forma de uma mistura.

[0153] Em um modo de realização particular da presente invenção, a composição tampão da presente invenção é fornecida em uma ou mais partes, a serem reconstituídas pelo usuário antes da análise. Isso pode permitir, por exemplo, atenuar um problema de estabilidade que pode se manifestar quando todos os componentes ou certos componentes da referida composição são condicionados na forma de uma mistura.

[0154] O kit da presente invenção pode ainda compreender uma ou mais solução(ões) de lavagem capilar e/ou uma ou mais barra(s) de diluição e/ou uma ou mais solução(ões) apropriada(s) para diluir a amostra biológica a ser analisada (por exemplo, uma solução hemolisante, em particular uma solução hemolisante tal como definida no presente pedido) e/ou uma ou mais amostra(s) biológica(s) de referência (por exemplo, frações glicadas naturais e/ou sintéticas, e se necessário, purificadas) para calibrar cada capilar.

[0155] A presente invenção tem igualmente por objeto o uso de uma composição tampão tal como definida no presente pedido e/ou de um kit da presente invenção, para a análise, por eletroforese capilar, de hemoglobinas glicadas (uma ou mais) que compreendem um ou mais resíduo(s) de glicose, em particular hemoglobinas A_{1c}, S_{1c} e C_{1c}, contidos em uma amostra biológica que compreende uma ou mais hemoglobina(s).

[0156] A presente invenção tem também por objeto o uso de uma composição tampão tal como definida no presente pedido e/ou de um kit da presente invenção e/ou de um composto capaz de complexar

especificamente resíduos de glicose (um ou mais) de hemoglobinas glicadas (uma ou mais hemoglobina(s) glicada(s)) e fornecer a essa ou essas hemoglobina(s) glicada(s) várias cargas elétricas negativas em pH alcalino, para separar, por eletroforese capilar, uma ou mais hemoglobina(s) glicada(s) que compreendem um resíduo de glicose ligado ao aminoácido que se encontra em posição N-terminal em pelo menos uma cadeia de globina (por exemplo, nas cadeias beta) e, mais particularmente, para separar, por eletroforese capilar, a hemoglobina A_{1c} de outras proteínas, em particular, de pelo menos outra hemoglobina e, de preferência, das hemoglobinas presente(s) em uma amostra biológica, e, se necessário, para dosar a ou as referidas hemoglobina(s) assim separada(s).

[0157] A composição tampão de acordo com a presente invenção, o kit de acordo com a presente invenção e/ou um composto capaz de complexar especificamente resíduos de glicose de hemoglobinas glicadas e de fornecer cargas elétricas negativas em pH alcalino tal como definido no presente pedido é em particular apropriados para um uso, por exemplo, no contexto de um método da presente invenção, para o diagnóstico da diabetes em um ser humano ou um mamífero não humano e/ou para o monitoramento do equilíbrio glicêmico de um ser humano ou de um mamífero não humano (em particular, um sujeito diabético), sobretudo para avaliar a eficácia de um tratamento contra a diabetes e/ou adaptar um tratamento contra a diabetes em um sujeito diabético. A ou as amostra(s) biológica(s) analisada(s) provêm então do referido ser humano ou do referido mamífero não humano.

[0158] O termo diabetes tal como utilizado no presente pedido refere-se à diabetes de tipo 1 e/ou a diabetes de tipo 2.

[0159] A presente invenção trata também do uso de uma composição tampão de acordo com a presente invenção, de um kit de acordo

com presente invenção e/ou de um composto capaz de complexar especificamente resíduos de glicose de hemoglobinas glicadas e de fornecer cargas negativas em pH alcalino, tal como definido na presente, para a fabricação de um kit de diagnóstico. O referido kit de diagnóstico pode ser usado em particular para o diagnóstico da diabetes em um ser humano ou em um mamífero não humano e/ou para monitorar o equilíbrio glicêmico de um ser humano ou de um mamífero não humano, em um sujeito diabético. O referido kit pode assim permitir avaliar a eficácia de um tratamento contra a diabetes em um ser humano ou em um mamífero não humano com diabetes e/ou adaptar um tratamento contra a diabetes em sujeitos diabéticos.

[0160] A taxa de HbA_{1c} está geralmente compreendida, entre 4 e 6% (ou seja, 20 a 42 mmols de HbA_{1c} por mols de hemoglobina no sangue) em um ser humano não diabético, e superior a 7% em um paciente diabético (na ausência de tratamento).

[0161] Se a taxa de HbA_{1c} estiver compreendida entre 6 e 7% (ou seja, uma concentração de 42 a 53 mmols por mols de hemoglobina HbA_{1c} no sangue), é aconselhável iniciar um tratamento antidiabético.

[0162] Para além do limiar de 8%, que equivalente a uma concentração de 64 mmols de HbA_{1c} por mols de hemoglobina no sangue (Panteghini et John, 2007), o paciente fica exposto a um risco aumentado de desenvolver de uma das complicações da diabetes (microangiopatia, macroangiopatia ...). É aconselhável modificar o tratamento antidiabético.

[0163] Outras características e vantagens da presente invenção aparecem nos exemplos a seguir e nas figuras que ilustram a realização da presente invenção.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0164] Figura 1: eletroferograma obtido em CE Agilent a partir de uma amostra de sangue humano qualquer utilizando o tampão de análise

descrito na patente US 5,599,433, que contém 100mM de CAPS e 300mM de ácido bórico (pH: 11.00; temperatura: 24°C; voltagem: 6.1 kV, ou seja, 190V/cm; injeção: 50 mbars 20s).

[0165] Figura 2: perfis eletroforéticos padrão $A_{1a,b}$ e A_{1c} obtidos em CE Agilent a partir de amostras de referência que contêm diferentes frações de hemoglobina glicada purificada utilizando o tampão de análise descrito na patente US 5,599,433, que contém 100mM de CAPS e 300mM de ácido bórico (pH: 11; temperatura: 24°C; voltagem: 6.1 kV, ou seja, 190V/cm; injeção: 50 mbars 20s).

[0166] Figura 3: perfis eletroforéticos padrão $A_{1a,b}$ e A_{1c} obtidos em CE Agilent a partir de amostras de referência que contêm diferentes frações de hemoglobina glicada purificada, utilizando uma composição tampão que contém 200mM de CAPSO e 10mM de putrescina mas que não contém um composto borato, nem um composto boronato (pH: 10.20; temperatura: 24°C; voltagem: 6.1 kV, ou seja, 190V/cm; injeção: 50 mbars 20s).

[0167] Figura 4: perfis eletroforéticos padrão $A_{1a,b}$ e A_{1c} obtidos em CE Agilent a partir de amostras de referência que contêm diferentes frações de hemoglobina glicada purificada, utilizando uma composição tampão que contém 200mM de CAPSO, 10mM de putrescina e 50mM de borato (pH: 10.20; temperatura: 24°C; voltagem: 6.1 kV, ou seja, 190V/cm; injeção: 50 mbars 20s).

[0168] Figura 5: perfis eletroforéticos padrão $A_{1a,b}$ e A_{1c} obtidos em CE Agilent a partir de amostras de referência que contêm diferentes frações de hemoglobina glicada purificada, utilizando uma composição tampão que contém 200mM de CAPSO, 10mM de putrescina e 50mM de ácido 3-dicarboxifenilborônico (pH: 10.20; temperatura: 24°C; voltagem: 6.1 kV, ou seja, 190V/cm; injeção: 50 mbars 20s).

[0169] Figura 6: perfis eletroforéticos padrão $A_{1a,b}$ e A_{1c} obtidos em CE Agilent a partir de amostras de referência que contêm diferentes frações de

hemoglobina glicada purificada, utilizando uma composição tampão que contém 200mM de CAPSO, 10mM de putrescina e 50mM de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico (pH: 10.20; temperatura: 24°C; voltagem: 6.1 kV, ou seja, 190V/cm; injeção: 50 mbars 20s).

[0170] Figura 7: perfis eletroforéticos padrão $A_{1a,b}$ e A_{1c} obtidos em CE Agilent a partir de amostras de referência que contêm diferentes frações de hemoglobina glicada purificada, utilizando uma composição tampão que contém 200mM de CAPSO, 15mM de putrescina e 100mM de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico (pH: 10.20; temperatura: 30°C; voltagem: 10 kV, ou seja, 310V/cm; injeção: 50 mbars 20s).

[0171] Figura 8: perfis eletroforéticos padrão A_0 , $A_{1a,b}$ e A_{1c} obtidos em CE Agilent a partir de amostras de referência que contêm de l^1HbA_0 e/ou diferentes frações de hemoglobina glicada purificada, utilizando uma composição tampão que contém 200mM de CHES, 20mM de putrescina e 30mM de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico em pH: 9.40. Capilar de sílica fundida, não revestido (temperatura: 34°C; voltagem: 17.3 kV, ou seja, 520V/cm; injeção 50mbars 20s).

[0172] Figura 9: perfis eletroforéticos padrão A_0 , $A_{1a,b}$ e A_{1c} obtidos em CE Agilent a partir de amostras de referência que contêm de $THbA_0$ e/ou diferentes frações de hemoglobina glicada purificada, utilizando uma composição tampão que contém 200mM de CHES, 20mM de putrescina e 30mM de ácido 3,4-dicarboxifenilborônico em pH: 9.40. Capilar de sílica fundida, não revestido (temperatura: 34°C; voltagem: 17.3 kV, ou seja, 520V/cm; injeção 50mbars 20s).

[0173] Figura 10: perfis eletroforéticos padrão $A_{1a,b}$ e A_{1c} obtidos com Capillars[®] (Sebia) a partir de amostras de referência que contêm diferentes frações de hemoglobina glicada purificada, utilizando uma composição tampão que contém 200mM de tampão CHES, 20mM de putrescina e 30mM de ácido

3,5-dicarboxifenilborônico, em pH 9.40. Capilar de sílica fundida, não revestido (temperatura: 34°C; voltagem: 9.4kV, ou seja, 520 V/cm; injeção 20 mbars 6s).

[0174] Figura 11: eletroferograma obtido com Capillarys® (Sebia) a partir de uma amostra de sangue humano qualquer diluída a 1/6 na solução hemolisante (água + 1 g/L de Triton X100), utilizando uma composição tampão que contém (A) 200 mM de tampão CAPSO, 10 mM de putrescina e 50 mM de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico em pH 10.2, ou, (B) 200mM de tampão CHES, 20mM de putrescina e 30mM de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico, em pH 9.40. Capilar de sílica fundida, não revestido (temperatura: 34°C; voltagem: 9.4kV, ou seja, 520 V/cm; injeção 8 mbars 6s).

[0175] Figura 13: eletroferograma obtido com Capillarys® (Sebia) a partir de uma amostra de sangue humano qualquer que compreende uma variante HbE, diluída a 1/6 na solução hemolisante (água + 1 g/L de Triton X100), utilizando uma composição tampão que contém 200mM de tampão CHES, 20mM de putrescina e 30mM de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico, em pH 9.40, e um capilar de sílica fundido, não revestido (temperatura: 34°C; voltagem: 9.4kV, ou seja, 520 V/cm; injeção 8 mbars 6s).

[0176] Figura 14: eletroferograma obtido com Capillarys® (Sebia) a partir de um controle AFSC diluído a 1/6 na solução hemolisante (água + 1 g/L de Triton X100), utilizando uma composição tampão que contém 200mM de tampão CHES, 20mM de putrescina e 30mM de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico, em pH 9.40, e um capilar de sílica fundida, não revestido (temperatura: 34°C; voltagem: 9.4kV, ou seja, 520 V/cm; injeção 8 mbars 6s).

[0177] Figura 15: eletroferograma obtido com Capillarys® (Sebia) a partir de um pool de sangue qualquer que compreende variantes F e Bart's, diluído a 1/6 na solução hemolisante (água + 1 g/L de Triton X100), utilizando uma composição tampão que contém 200mM de tampão

CHES, 20mM de putrescina e 30mM de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico, em pH 9.40, e um capilar de sílica fundido, não revestido (temperatura: 34°C; voltagem: 9.4kV, ou seja, 520 V/cm; injeção 8 mbars 6s).

[0178] Figura 16: eletroferograma obtido com Capillarys® (Sebia) a partir de uma amostra de sangue humano qualquer que compreende uma variante HbD, diluída a 1/6 na solução hemolisante (água + 1 g/L de Triton X100), utilizando uma composição tampão que contém 200mM de tampão CHES, 20mM de putrescina e 30mM de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico, em pH 9.40, e um capilar de sílica fundido, não revestido (temperatura: 34°C; voltagem: 9.4kV, ou seja, 520 V/cm; injeção 8 mbars 6s).

[0179] Figura 18A: Gel de agarose HbA₁₀ realizado em autômato Hydrasys® (Sebia). Pistas 1 e 2: calibrador A_{1c} fraco (5,0%) e calibrador A_{1c} forte (10,8%). Pistas 3 a 9: sangue qualquer total incubado 3h a 37°C com glicose a uma concentração de 0 g/L (referência; pista 3), 1g/L (pista 4), 5g/L (pista 5), 10g/L (pista 6), 20g/L (pista 7), 30g/L (pista 8) e 50g/L (pista 9).

[0180] Figura 18B: perfis de eletroforese capilar obtidos com o analisador Capillarys® (Sebia) com as mesmas amostras que as da figura 18A. A análise não foi, todavia, realizada para a amostra que contém 1 g/L de glicose pois não há uma diferença visível de gel (figura 18A). Amostras diluídas a 1/6 na solução hemolisante (água + 1g/L de Triton X100), utilizando uma composição tampão que contém 200mM de tampão CHES, 20mM de putrescina e 30mM de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico, em pH 9.40, e um capilar de sílica fundido, não revestido (temperatura: 34°C; voltagem: 9.4kV, ou seja, 520 V/cm; injeção 8 mbars 6s).

[0181] Figura 18C: quadro recapitulativo dos valores de HbA_{1c} obtidos em gel de agarose e com o analisador Capillarys® (Sebia) para as

análises dos sangues apresentados nas figuras 18A e 18B.

| Concentração em glicose (g/L) | % A1c gel | % A1c EC |
|-------------------------------|-----------|----------|
| 0 (controle) | 4.1 | 4.2 |
| 1 | 4.5 | - |
| 5 | 4.6 | 4.3 |
| 10 | 5.3 | 4.3 |
| 20 | 7.8 | 4.1 |
| 30 | 8.6 | 4.1 |
| 50 | 14.8 | 4.1 |

EXEMPLOS

A - MATERIAIS E MÉTODOS

ELETROFORESE CAPILAR

[0182] O princípio de separação é a eletroforese capilar em solução livre em pH alcalino ($\text{pH} > 9$), a fim de obter frações de hemoglobinas carregadas negativamente (o ponto isoelétrico das hemoglobinas está compreendido entre 6,05 e 7,63).

[0183] A eletroforese capilar de amostras biológicas é realizada em um aparelho de eletroforese capilar dotado de 8 capilares de sílica fundida com um diâmetro interno de 25 microns, um comprimento útil de 16 cm e um comprimento total de 18 cm (sistema de eletroforese capilar Capillarys (Sebia)) ou em um aparelho de eletroforese capilar dotado de um capilar de sílica fundida com um diâmetro interno de 25 microns, um comprimento útil de 24 cm e um comprimento total de 32 cm (sistema de eletroforese capilar ^{3D}CE da Agilent Technologies).

[0184] A detecção é realizada a um comprimento de onda de 415nm. As amostras de sangue são diluídas em uma solução hemolisante (Triton X100 1 g/L na água) e injetadas por injeção hidrodinâmica. O capilar é lavado antes de cada análise com soda 0,25 M, e depois com a composição tampão.

COMPOSIÇÃO TAMPÃO

[0185] As composições tampão nas quais a eletroforese capilar é realizada compreendem água, um composto tampão de pKa compreendido entre 8 e 11 (CAPS, CAPSO ou CHES conforme os casos), uma base que permite ajustar o pH ao valor desejado, eventualmente um retardador de fluxo (putrescina), e eventualmente um composto borato (ácido bórico) ou boronato.

[0186] O ácido 3,5-dicarboxifenilborônico (3,5-dCPBA) foi obtido junto às empresas Combi-blocks Inc. (San Diego, USA) e Apollo Scientific Ltd (Cheshire, Reino Unido).

[0187] O ácido 3,5-dicarboxifenilborônico (3,4-dCPBA) foi sintetizado pela BoroChem SAS (Caen, França).

B - RESULTADOS

EXEMPLO 1

[0188] Uma eletroforese capilar foi realizada a partir de um sangue humano qualquer (que compreende hemoglobinas HbA₀, HbA₁ e HbA₂) diluído a 1/6 em uma solução hemolisante (1g/L de Triton X100 dissolvido em água desmineralizada), utilizando o tampão de análise descrito na patente US 5,599,433, que contém 100mM de CAPS e 300mM de ácido bórico, pH 11. O eletroferograma obtido é apresentado na figura 1. Constata-se que a separação entre os picos de hemoglobinas é ruim.

EXEMPLO 2

[0189] Uma eletroforese capilar foi realizada a partir de amostras de referência (Exocell, USA), que contêm diferentes frações de hemoglobina glicada purificada (frações A₀ e A_{1c} ou frações A₀, A_{1b} e A_{1a}), utilizando o tampão de análise descrito na patente US 5,599,433, que contém 100mM de CAPS e 300mM de ácido bórico, pH 10.20. Os perfis eletroforéticos padrão A_{i,a,b} e A_{1c} obtidos são apresentados na figura 2. Constata-se claramente que a separação entre as hemoglobinas HbA_{1c} e HbA_{a,b} é insuficiente; o pico eletroforético HbA_{1c}

se superpõe aos picos de HbA_{1a}/HbA_{1b}.

EXEMPLO 3

[0190] Uma eletroforese capilar foi realizada a partir de amostras de referência (Exocell, USA), que contêm diferentes frações de hemoglobina glicada purificada (frações A₀ e A_{1c} ou frações A₀, A_{1b} e A_{1a}), utilizando uma composição tampão que contém 200mM de CAPSO e 10mM de putrescina (pH10.20) mas que não contém um composto borato, nem um composto boronato. Os perfis eletroforéticos padrão A_{1a,b} e A_{1c} obtidos são apresentados na figura 3. O pico que corresponde a HbA_{1c} co-migra com o de HbA₀.

EXEMPLO 4

[0191] Uma eletroforese capilar foi realizada a partir de amostras de referência (Exocell, USA), que contêm diferentes frações de hemoglobina glicada purificada (frações A₀ e A_{1c} ou frações A₀, A_{1b} e A_{1a}), utilizando uma composição tampão que contém 200mM de CAPSO, 10mM de putrescina e 50mM de borato (pH 10.20). Os perfis eletroforéticos padrão A_{1a,b} e A_{1c} obtidos são apresentados na figura 4. O pico que corresponde a HbA_{1c} encontra-se entre os picos que correspondem a HbA₀ e HbA_{1a}/HbA_{1b} e é muito próximo do pico que corresponde às outras HbA₁ para permitir uma dosagem confiável de HbA_{1c}.

EXEMPLO 5

[0192] Uma eletroforese capilar foi realizada a partir de amostras de referência (Exocell, USA), que contêm diferentes frações de hemoglobina glicada purificada (frações A₀ e A_{1c} ou frações A₀, A_{1b} e A_{1a}), utilizando uma composição tampão que contém 200mM de CAPSO, 10mM de putrescina e 50mM de ácido 3-carboxifenilborônico (pH 10.20). Os perfis eletroforéticos padrão A_{1a,b} e A_{1c} obtidos são apresentados na figura 5. O pico que corresponde a HbA_{1c} encontra-se entre os picos que correspondem a HbA_{1b} e HbA_{1a}.

EXEMPLO 6

[0193] Uma eletroforese capilar foi realizada a partir de amostras

de referência (Exocell, USA), que contêm diferentes frações de hemoglobina glicada purificada (frações A₀ e A_{1c} ou frações A₀, A_{1b} e A_{1a}), utilizando uma composição tampão que contém 200mM de CAPSO, 10mM de DAB e 50mM de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico (pH 10.20). Os perfis eletroforéticos padrão A_{1a,b} e A_{1c} obtidos são apresentados na figura 6. O pico que corresponde a HbA_{1c} encontra-se após os que correspondem a HbA_{1b} e HbA_{1a}.

EXEMPLO 7

[0194] Uma eletroforese capilar foi realizada a partir de amostras de referência (Exocell, USA) que contêm diferentes frações de hemoglobina glicada purificada (frações A₀ e A_{1c} ou frações A₀, A_{1b} e A_{1a}), utilizando uma composição tampão que contém 200mM de CAPSO, 15mM de retardador de fluxo (putrescina) e 100mM de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico (pH 10.20). Os perfis eletroforéticos padrão A_{1a,b} e A_{1c} obtidos são apresentados na figura 7. Constata-se que o pico que corresponde a HbA_{1c} encontra-se após os picos que correspondem a HbA_{1b} e HbA_{1a} e é bem distinto desses picos; a separação entre a hemoglobina HbA_{1c} e as hemoglobinas HbA_{1a} e HbA_{1b} é excelente.

EXEMPLO 8

[0195] Uma eletroforese capilar foi realizada a partir de amostras de referência que contêm a HbA₀ e/ou diferentes frações de hemoglobina glicada purificada (frações A₀ e A_{1c} ou frações A₀, A_{1b} e A_{1a}), utilizando uma composição tampão que contém 200mM de CHES, 20mM de retardador de fluxo (putrescina) e 30mM de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico (em pH: 9.40). Os perfis eletroforéticos padrão A₀, A_{1a,b} e A_{1c} obtidos são apresentados na figura 8. Constata-se que o pico que corresponde a HbA_{1c} encontra-se após os picos que correspondem a HbA₀, HbA_{1b} e HbA_{1a} e é bem distinto desses picos; a separação entre a hemoglobina HbA_{1c} e as hemoglobinas HbA_{1a} e HbA_{1b} é excelente.

EXEMPLO 9

[0196] Uma eletroforese capilar foi realizada a partir de amostras

de referência que contêm de a HbA₀ e/ou diferentes frações de hemoglobina glicada purificada (frações A₀ e A_{1c} ou frações A₀, A_{1b} e A₁₃), utilizando uma composição tampão que contém 200mM de CHES, 20mM de retardador de fluxo (putrescina) e 30mM de ácido 3,4-dicarboxifenilborônico (em pH: 9.40). Os perfis eletroforéticos padrão A₀, A_{1a,b} e A_{1c} obtidos são apresentados na figura 9. Constata-se que o pico que corresponde a HbA_{1c} encontra-se após os picos que correspondem a HbA₀, HbA_{1b} e HbA_{1a} e é bem distinto desses picos; a separação entre a hemoglobina HbA_{1c} e as hemoglobinas HbA₁₃ e HbA_{1b} é excelente.

[0197] Comparando os perfis eletroforéticos dos exemplos 8 e 9, constata-se que o ácido 3,5-dicarboxifenilborônico permite obter um resultado ligeiramente melhor em termos de separação da HbA_{1c} em relação às outras frações, ao passo que o ácido 3,4-dicarboxifenilborônico permite obter um resultado ligeiramente melhor em termos de focalização.

EXEMPLO 10

[0198] Uma eletroforese capilar foi realizada com Capillarys® (Sebia) a partir de amostras de referência (Exocell, USA) que contêm diferentes frações de hemoglobina glicada purificada (frações A₀ e A_{1c} ou frações A₀, A_{1b} e A_{1a}), utilizando uma composição tampão que contém 200mM de tampão CHES, 20mM de putrescina e 30mM de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico, em pH 9.40. Os perfis eletroforéticos padrão A_{1a,b} e A_{1c} obtidos são apresentados na figura 10. Constata-se que o pico que corresponde a HbA_{1c} encontra-se após os picos que correspondem a HbA_{1b} e HbA_{1a} e é bem distinto desses picos; a separação entre a hemoglobina HbA_{1c} e as hemoglobinas HbA_{1a} e HbA_{1b} é excelente.

EXEMPLO 11

[0199] Análises por eletroforese capilar foram realizadas a partir de um sangue humano qualquer diluído a 1/6 na solução hemolisante (água + 1 g/L de Triton X100), utilizando uma composição tampão que contém seja 200mM de tampão CAPSO, 10mM de putrescina e 50mM de ácido 3,5-

dicarboxifenilborônico, em pH 10.20, seja 200mM de tampão CHES, 20mM de putrescina e 30mM de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico, em pH 9.40. Os eletroferogramas obtidos com Capillarys® (Sebia) utilizando um capilar de sílica fundida, não revestido, são apresentados nas figuras 11A e 11 B, respectivamente. Foi observada nos 2 casos uma separação perfeita da hemoglobina HbA_{1c} das outras formas de hemoglobinas.

EXEMPLO 12

[0200] Estudou-se a influência da concentração de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico na composição tampão sobre a separação entre as hemoglobinas A_{1c} e A₀. A composição tampão utilizada continha 200mM de CAPSO, 15mM de Putrescina e 0 a 120mM de 3,5-dicarboxifenilborônico. Os resultados são apresentados na Tabela A. Constata-se que a separação A_{1c} / A₀ aumenta com a concentração de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico.

TABELA A

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO 3,5-DICARBOXIFENILBORÔNICO NA COMPOSIÇÃO TAMPÃO SOBRE A SEPARAÇÃO ENTRE AS HEMOGLOBINAS A_{1c} E A₀

(TEMPERATURA: 30°C; VOLTAGEM: 10kV, OU SEJA, 310V/CM).

| [3,5-dCPBA] | $\Delta t = t A_{1c} - t A_0$ (min) | $\Delta t/t = [t A_{1c} - t A_0] / t A_0$ | T A ₀ (min) |
|-------------|-------------------------------------|---|------------------------|
| 0 | 0 | 0 | 18,042 |
| 10 | 0,918 | 0,050 | 18,316 |
| 20 | 1,757 | 0,093 | 18,96 |
| 30 | 2,018 | 0,104 | 19,341 |
| 30 | 1,979 | 0,105 | 18,927 |
| 40 | 2,264 | 0,116 | 19,502 |
| 50 | 2,546 | 0,127 | 19,991 |
| 60 | 2,885 | 0,139 | 20,699 |
| 70 | 3,04 | 0,143 | 21,218 |
| 80 | 3,224 | 0,149 | 21,688 |
| 90 | 3,56 | 0,158 | 22,495 |
| 100 | 3,998 | 0,172 | 23,249 |
| 120 | 4,568 | 0,187 | 24,478 |

EXEMPLO 13

[0201] Eletroforeses capilares foram realizadas com Capillarys® (Sebia) a partir de quatro amostras diferentes diluídas a 1/6 na solução hemolisante (água + 1 g/L de Triton X100): sangue humano qualquer que compreende uma variante HbE (figura 13), um controle AFSC (figura 14), um pool de sangues quaisquer que compreende variantes F e Bart's (figura 15) e um sangue humano qualquer que compreende uma variante HbD (figura 16). A eletroforese capilar foi realizada em uma composição tampão que contém 200mM de tampão CH ES, 20mM de putrescina e 30mM de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico, em pH 9.40, utilizando um capilar de sílica fundida, não revestido.

[0202] As figuras 13-16 mostram a ausência de interferências das principais variantes da hemoglobina (E, F, S, C, D e Bart) com a fração HbA_{1c}. Nota-se, todavia, que no caso da hemoglobina Bart, a resolução não é total entre as frações Hb Bart e HbA_{1c}. Conseqüentemente, para poder dosar a HbA_{1c} em presença de Hb Bart, é preciso poder quantificar essas duas frações graças a um método de integração apropriado. Se isso não for possível, será preciso alertar o usuário a esse respeito, na eventualidade de ele observar esse tipo de perfil com ressalto sobre o pico esperado.

EXEMPLO 14

[0203] Os resultados obtidos por eletroforese capilar pelo método da presente invenção utilizando o analisador Capillarys® (Sebia) foram comparados com os resultados obtidos com uma das técnicas de referência: a HPLC com um analisador Variant II Turbo® (Bio-Rad).

[0204] A eletroforese capilar foi realizada a partir de sangues totais diluídos a 1/6 na solução hemolisante (água + 1 g/L de Triton X100), em uma composição tampão que contém 200mM de tampão CHES, 20mM de putrescina e 30mM de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico, em pH 9.40.

[0205] A Tabela B mostra a excelente correlação dessa nova técnica de análise por eletroforese capilar com a análise da HbA_{1c} por HPLC com o Variant II turbo® de Bio-Rad. Após calibração dos dados EC utilizando 2 calibradores (A_{1c} fraco e A_{1c} forte), os valores obtidos pelo método da presente invenção são muito próximos dos valores obtidos pelo método de referência.

TABELA B

COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS PELOS INVENTORES POR ELETROFORESE CAPILAR COM O ANALISADOR CAPILLARYS® (SEBIA) COM OS RESULTADOS OBTIDOS POR HPLC COM O ANALISADOR VARIANT II TURBO® (BIO-RAD).

| Amostra | % A_{1c} – HPLC | Valores brutos % A_{1c} - EC | Valores corrigidos % A_{1c} – EC | Coluna HPLC – EC corrigido |
|----------------|--------------------------------|---|---|-----------------------------------|
| 1 | 5,5 | 3,9 | 5,3 | 0,2 |
| 2 | 6,9 | 5,5 | 6,7 | 0,2 |
| 3 | 7,1 | 6,1 | 7,1 | 0,0 |
| 4 | 8,9 | 8,4 | 8,7 | 0,2 |
| 5 | 6,6 | 5,5 | 6,8 | -0,2 |
| 6 | 8,3 | 7,3 | 8,4 | -0,1 |
| 7 | 5,1 | 4,1 | 5,4 | -0,3 |
| 8 | 6,4 | 5,2 | 6,5 | -0,1 |
| 9 | 6,5 | 4,9 | 6,2 | 0,3 |
| 10 | 6,1 | 4,7 | 6,0 | 0,1 |
| 11 | 5,2 | 3,6 | 5,3 | -0,1 |
| 12 | 12,7 | 13,3 | 12,5 | 0,2 |
| 13 | 6,4 | 5,5 | 6,6 | -0,2 |
| 14 | 6,5 | 5,0 | 6,3 | 0,2 |
| 15 | 7,0 | 5,8 | 6,8 | 0,2 |
| 16 | 9,4 | 8,9 | 9,0 | 0,4 |
| 17 | 5,3 | 3,9 | 5,5 | -0,2 |
| 18 | 7,5 | 6,2 | 7,5 | 0,0 |
| 19 | 6,2 | 4,7 | 6,1 | 0,1 |
| 20 | 6,8 | 5,7 | 6,8 | 0,0 |
| 21 | 7,9 | 7,1 | 7,9 | 0,0 |
| 22 | 9,3 | 8,9 | 9,2 | 0,1 |
| 23 | 5,2 | 3,8 | 5,3 | -0,1 |
| 24 | 8,3 | 7,4 | 8,3 | 0,0 |
| 25 | 8,0 | 6,9 | 8,1 | -0,1 |
| 26 | 8,9 | 8,2 | 8,8 | 0,1 |
| 27 | 6,3 | 5,1 | 6,3 | 0,0 |
| 28 | 6,1 | 4,6 | 6,0 | 0,1 |
| 29 | 7,6 | 6,6 | 7,5 | 0,1 |
| 30 | 8,8 | 8,1 | 8,5 | 0,3 |
| 31 | 7,7 | 6,7 | 7,7 | 0,0 |

EXEMPLO 15**ESTUDO QUE DEMONSTRA A AUSÊNCIA DE INTERFERÊNCIA DA FRAÇÃO LÁBIL DA HbA_{1c} COM A DOSAGEM DA HbA_{1c} PELO MÉTODO DE ACORDO COM A INVENÇÃO**

[0206] Na hipótese de que composto que complexa a glicose e fornece cargas negativas em pH alcalino utilizado no método de análise da presente invenção seja capaz de interagir com a glicose sanguínea (essa interação é hipotética e não demonstrada), um estudo de eventual interferência da glicose livre sobre o resultado da dosagem da HbA_{1c} foi realizada da seguinte maneira: um sangue qualquer foi incubado durante 3 horas a 37°C com diferentes concentrações de glicose (de 0 a 50g/L), de modo a criar uma forma lábil da HbA_{1c} (forma obtida antes do rearranjo da molécula (rearranjo de Amadori)). Depois de realizada a incubação, as amostras de sangues foram centrifugadas e os sedimentos obtidos foram reconstituídos em água fisiológica e a solução hemolisante (15µl de sedimento + 25µL de água fisiológica + 160µl de solução hemolisante (água + 1g/L Triton X100)) e depois analisadas paralelamente em um autômato Hydrasys[®] da Sebia (gel HbA_{1c}) e com técnica Capillarys[®] (Sebia) utilizando a composição tampão que contém 200mM de tampão CHES, 20mM de putrescina e 30mM de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico, em pH 9.40.

[0207] O gel HbA_{1c} obtido pela análise com o autômato Hydrasys[®] (ver a figura 18A) permite confirmar a formação de fração lábil da HbA_{1c} que migra ao mesmo nível que a HbA_{1c} e em concentração crescente à medida que a concentração de glicose aumenta durante a incubação com o sangue. Deve-se notar que em gel, nas condições normais de uso definidas pela Sebia, a fração lábil não aparece, em particular em virtude do pH ácido da solução hemolisante.

[0208] As análises efetuadas com Capillarys[®] (Sebia) com uma composição tampão da presente invenção (200mM de tampão CHES, 20mM de putrescina e 30mM de ácido 3,5-dicarboxifenilborônico, em pH

9.40), nas mesmas amostras de sangues, mostram inversamente que a dosagem não é perturbada pela presença de glicose livre, qualquer que seja a concentração de glicose incubada, no intervalo estudado (0 a 50g/L): os perfis e os valores da HbA1c não se alteraram (ver figuras 18B e 18C).

REFERÊNCIAS

- Abraham, E. C.; Cameron, B. F.; Abraham, A.; Stallings, M., "Glycosylated hemoglobins in heterozygotes and homozygotes for hemoglobin C with or without diabetes", Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 104, 602-609, 1984.

- Beccaria, L.; Chiumello, G.; Gianazza, E.; Luppis, B.; Righetti, PG., "Hemoglobin A₁₀ separation by isoelectric focusing", American Journal of Hematology, 4, 367-374, 1978.

- Bosisio, A.; Righetti, P., "Determination of glycosylated haemoglobin by isoelectric focusing in non-linear pH gradients", Journal of Chromatography, 307, 103-110, 1984.

- Doelman, C; Siebelder, C; Nijhof, W.; Weykamp, W.; Janssens, J.; Penders, T., "Capillary electrophoresis System for hemoglobin A_{1c} determinations evaluated", Clinical Chemistry, 43, 4, 644-648, 1997.

- Hempe, JM.; Craver, RD., "Quantification of hemoglobin variants by capillary isoelectric focusing", Clinical Chemistry, 40,12, 2288-2295, 1994.

- Hempe, JM.; Granger, JN.; Craver, RD., "Capillary isoelectric focusing of hemoglobin variants in the pediatric clinical laboratory", Electrophoresis, 18, 1785-1795, 1997.

- Janssens, J., "Capillary electrophoresis detection and/or analysis method and unit", EP 0 733 900 A2, 1996.

- Janssens, J.; Chevigné, P.; Louis, P., "Capillary electrophoresis method using initialized capillary and polyanion-containing buffer and chemical kit therefore", US Patent 5,611,903, 1997.

- Menard, L; Dempsey, M.; Blankstein, L; Aleyassine, H.; Wacks, M.; Soeldner, J., "Quantitative determination of glycosylated hemoglobin A1 by agar gel electrophoresis", *Clinical Chemistry*, 26, 11, 1598-1602, 1980.

- Molteni, S.; Frischknecht, H.; Thormann, W., "Application of dynamic capillary isoelectric focusing to the analysis of human hemoglobin variants", *Electrophoresis*, 15, 22-30, 1994.

- Panteghini, M. John, W. G., on behalf of the IFCC Scientific Division, "Implementation of haemoglobin A_{1c} results traceable to the IFCC reference System: the way forward.", *Clin Chem Lab Med.*, 45(8), 942-4, 2007.

- Simon, M.; Cuan J., "Hemoglobin A_{1c} by isoelectric focusing", *Clinical Chemistry*, 28,1, 9-12, 1982.

- Siren, H.; Laitinen, P.; Turpeinen, U.; Karppinen, P., "Direct monitoring of glycohemoglobin A_{1c} in the blood samples of diabetic patients by capillary electrophoresis. Comparison with an immunoassay method", *Journal of Chromatography A*, 979, 201-207, 2002.

- Stickland, M.; Perkins, C; Wales, J., "The measurement of haemoglobin A_{1c} by isoelectric focusing in diabetic patients", *Diabetologia*, 22, 315-317, 1982.

- Wilson, D.H., Bogacz, J. P., Forsythe, CM., Turk, PJ. , Lane, T.L., Gates, R. C, Brandt, D. R. "Fully automated assay of glycohemoglobin with the Abbott IMx analyzer: novel approach for separation and detection", *Clin Chem.*, 39(10), 2090-7, 1993.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO PARA ANÁLISE *IN VITRO* POR ELETROFORESE CAPILAR, de uma ou mais hemoglobina(s) glicada(s), que compreende pelo menos uma cadeia beta de globina que compreende um resíduo de glicose ligado ao aminoácido que se encontra em posição N-terminal da cadeia beta de globina, as referidas hemoglobinas glicadas estando contidas em uma amostra biológica que compreende hemoglobinas, em que o método é caracterizado por compreender as seguintes etapas:

(a) introdução de uma amostra biológica e uma composição tampão em um capilar de eletroforese, em que dita composição tampão compreende pelo menos um composto capaz de complexar especificamente resíduos de glicose ligados a um aminoácido que se encontra em posição N-terminal das hemoglobinas glicadas da amostra biológica, e o fornecimento a essa(s) hemoglobina(s) glicada(s), de várias cargas elétricas negativas em pH alcalino, em que o referido composto compreende dois ou mais de dois grupos funcionais, sendo que:

(i) pelo menos um de tais grupos funcionais, complexa especificamente um ou mais resíduo(s) de glicose, fornecendo, assim, uma carga elétrica negativa pelo resíduo de glicose complexado, e

(ii) o outro, um dos outros ou todos os outros grupos funcionais, que não complexam o referido um ou mais resíduos de glicose, fornece(m) a(s) referida(s) hemoglobina(s) glicada(s) com uma ou mais cargas elétricas negativas adicionais a um pH alcalino,

(b) separação dos constituintes da amostra biológica por eletroforese capilar; e

(c) detecção de uma ou mais hemoglobina(s) presente(s) na amostra biológica, e geração de um eletroferograma a partir do sinal de detecção, que é proporcional à quantidade de hemoglobina(s) detectada(s).

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser para a análise por eletroforese capilar da hemoglobina A_{1c} contida em uma amostra biológica que compreende hemoglobinas.

3. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, caracterizado pelo referido composto capaz de complexar especificamente resíduos de glicose de hemoglobinas glicadas, da amostra biológica e de fornecer cargas negativas em pH alcalino compreender um (ou mais) grupo(s) boronila e/ou boronato e, em particular:

(i) um composto boronato de fórmula geral $RB(OH)_2$ ou $RB(OH)_3^-$, no qual o grupo R compreende pelo menos uma arila e/ou uma alquila (linear, ramificada ou cíclica) e/ou uma aralquila e/ou outros grupos funcionais ou heteroátomos, e/ou uma combinação desses grupos, e o referido grupo R fornece hemoglobinas glicadas com uma ou mais carga(s) elétrica(s) negativa(s) em pH alcalino para cada resíduo de glicose complexado com o grupo boronato; ou

(ii) um sal do referido composto boronato.

4. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pela concentração, na composição tampão, do composto que complexa especificamente resíduos de glicose de hemoglobina(s) glicada(s) da amostra biológica e fornece cargas negativas em pH alcalino, estar em excesso estequiométrico em relação à quantidade total de proteínas, em relação à quantidade total de todas as hemoglobinas presentes na amostra biológica ou em relação à quantidade total de todas as hemoglobinas que compreendem glicose presentes na amostra biológica.

5. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pela composição tampão compreender ainda um retardador de fluxo, em particular, um retardador de fluxo que é uma diamina alifática, mais particularmente uma diamina alifática escolhida entre 1,3-diaminopropano, 1,4-

diaminobutano (putrescina), 1,5-diaminopentano (cadaverina), 1-6-diaminohexano, espermina e DETA, ou um derivado da referida diamina alifática, por exemplo, uma poliamina alifática, uma poliamina cíclica ou um sal de diamina alifática, ou uma de suas misturas, e mais particularmente ainda um retardador de fluxo que é a putrescina ou um derivado.

6. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pela composição tampão compreender ainda:

- um composto tampão que possui um pKa na faixa de 8,0 a 11,0;
e/ou
- uma base; e/ou
- um sal, em particular um sal de sódio, por exemplo, cloreto de sódio e/ou
- uma solução de diluição apropriada, por exemplo, água.

7. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pela composição tampão possuir um pH superior ou igual a 9, de preferência entre 9,0 e 11,0 e, mais preferencialmente, um pH entre 9,0 e 10,0, por exemplo um pH de 9,4.

8. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado por:

- o composto que complexa especificamente resíduos de glicose de hemoglobinas glicadas e fornece cargas negativas em pH alcalino compreende um ou mais grupos anionizáveis em pH alcalino, em particular um ou mais carboxilato(s), carboxila(s), sulfonato(s) e/ou sulfonila(s), e/ou
- o composto boronato, conforme definido na reivindicação 3:
 - é um fenilboronato polisubstituído,
 - em particular é um fenilboronato dissustituído, por exemplo, com grupos carboxila(s) e/ou sulfonila(s),
 - mais particularmente é um composto no qual o grupo R é

um diácido, de preferência um ácido dicarboxílico,

- ainda mais particularmente, é um ácido dicarboxifenilborônico, escolhido de preferência entre ácido 3,4-dicarboxifenilborônico e o ácido 3,5-dicarboxifenilborônico, mais preferencialmente o ácido 3,5-dicarboxifenilborônico, e/ou

- a concentração, na composição tampão, do composto que complexa especificamente resíduos de glicose de hemoglobinas glicadas e fornece cargas negativas em pH alcalino está compreendida entre 0,10 e 100 mM, de preferência entre 10 e 60 mM, e mais preferencialmente entre 20 e 50 mM, por exemplo 30 mM, e/ou

- a concentração do retardador de fluxo na composição tampão está compreendida entre 0,10 e 40 mM, de preferência entre 10 e 30 mM e mais preferencialmente entre 15 e 25 mM, por exemplo, 20 mM, e/ou

- o composto tampão, conforme definido na reivindicação 6, é um composto zwitteriônico, em particular um composto escolhido entre AMP, AMPD, AMPSO, bicina, CABS, CAPS, CAPSO, CHES, HEPBS, metilamina, TABS, TAPS, taurina, tricina e Tris, por exemplo, CHES, CAPS ou CAPSO, e/ou

- a concentração do composto tampão, conforme definido na reivindicação 6, na composição tampão está compreendida entre 20 e 500 mM, de preferência entre 50 e 400 mM, e mais preferencialmente entre 150 e 300 mM, por exemplo, 200mM.

9. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado por compreender ainda:

- uma etapa de determinação, em particular a partir de um eletroferograma, conforme definido na reivindicação 1, da quantidade de uma ou mais hemoglobina(s) presente(s) na amostra biológica e/ou da proporção de uma ou mais hemoglobina(s) presente(s) na amostra biológica em relação à quantidade total de proteínas, à quantidade total de hemoglobina ou à

quantidade de certas hemoglobinas presentes na amostra biológica; e/ou

- uma etapa de quantificação de uma ou mais hemoglobina(s) presente(s) na amostra biológica em relação a um ou mais calibrador(es) padronizado(s).

10. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pela amostra biológica ser uma amostra de sangue, em particular uma amostra de sangue normal ou não, lavada, decantada, centrifugada ou total, e a referida amostra é, se necessário, hemolisada.

11. MÉTODO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pela amostra biológica ser diluída em uma solução hemolisante, em particular, uma solução hemolisante escolhida entre o grupo constituído por:

- água pura;
- água com adição de tensoativo, em particular água com adição de Triton;
- uma solução aquosa de Triton X100, em particular uma solução aquosa de Triton X100 1g/L; e
- suas misturas.

12. COMPOSIÇÃO TAMPÃO, apropriada para a análise por eletroforese capilar de uma ou mais hemoglobinas glicadas, que compreende um resíduo de glicose ligado ao aminoácido que se encontra em posição N-terminal nas cadeias beta de globina, contidas em uma amostra biológica que compreende uma ou mais hemoglobina(s), caracterizada pela referida composição compreender pelo menos um composto que complexa especificamente resíduos de glicose ligados a um aminoácido na posição N-terminal das hemoglobinas glicadas, de modo a fornecer a essa(s) hemoglobina(s) glicada(s) várias cargas elétricas negativas em pH alcalino, em que dito pelo menos um composto compreende um (ou mais) grupo(s) boronila

e/ou boronato, e é:

(i) um composto boronato de fórmula geral $RB(OH)_2$ ou $RB(OH)_3$, no qual o grupo R compreende pelo menos uma arila e/ou uma alquila (linear, ramificada ou cíclica) e/ou uma aralquila e/ou outros grupos funcionais ou heteroátomos, e/ou uma combinação desses, e o referido grupo R fornece hemoglobinas glicada com duas ou mais de duas carga(s) elétrica(s) negativa(s) em pH alcalino para cada resíduo de glicose complexado com o grupo boronato; ou

(ii) um sal de dito composto boronato.

13. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada por ser conforme definida em qualquer uma das reivindicações 4 a 8.

14. KIT, caracterizado por compreender uma composição tampão, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 12 a 13, e instruções para uso, se necessário.

15. USO DE UMA COMPOSIÇÃO TAMPÃO, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 8 ou 12 a 13, caracterizado por ser para a separação, por eletroforese capilar *in vitro*, de uma ou mais hemoglobina(s) glicada(s) que compreende(m) pelo menos uma cadeia beta de globina que compreende um resíduo de glicose ligado ao aminoácido na posição N-terminal, de outras proteínas, em particular de pelo menos outra hemoglobina e, de preferência, de outra(s) hemoglobina(s) presente(s) em uma amostra biológica.

16. USO DE UM KIT, conforme definido na reivindicação 14, caracterizado por ser para a separação, por eletroforese capilar *in vitro*, de uma ou mais hemoglobina(s) glicada(s) que compreende(m) pelo menos uma cadeia beta de globina que compreende um resíduo de glicose ligado ao aminoácido na posição N-terminal, de outras proteínas, em particular de pelo menos outra hemoglobina e, de preferência, de outra(s) hemoglobina(s) presente(s) em uma

amostra biológica.

Electroferograma(s) Atual(is)

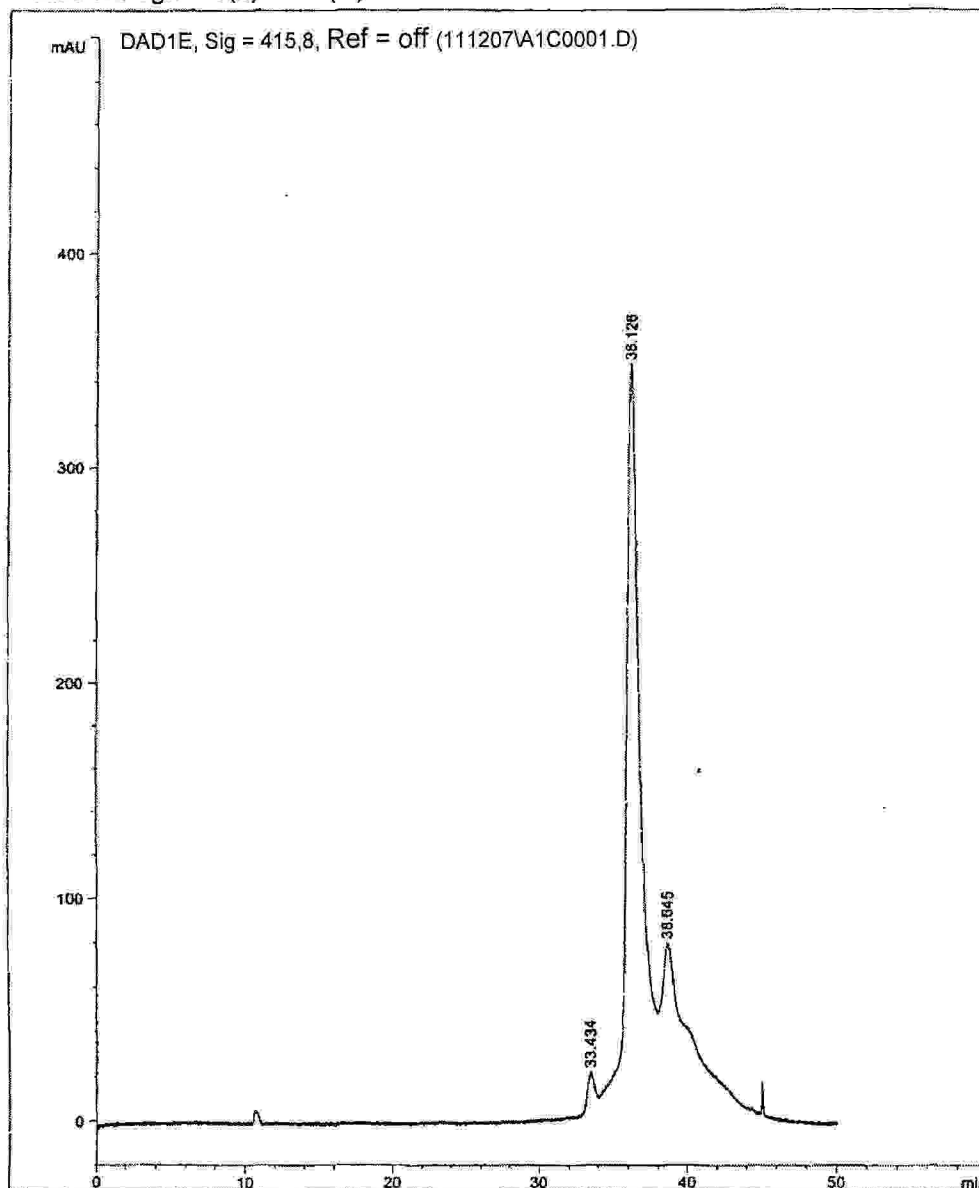


Fig.1

Eletroferograma(s) Atual(is)

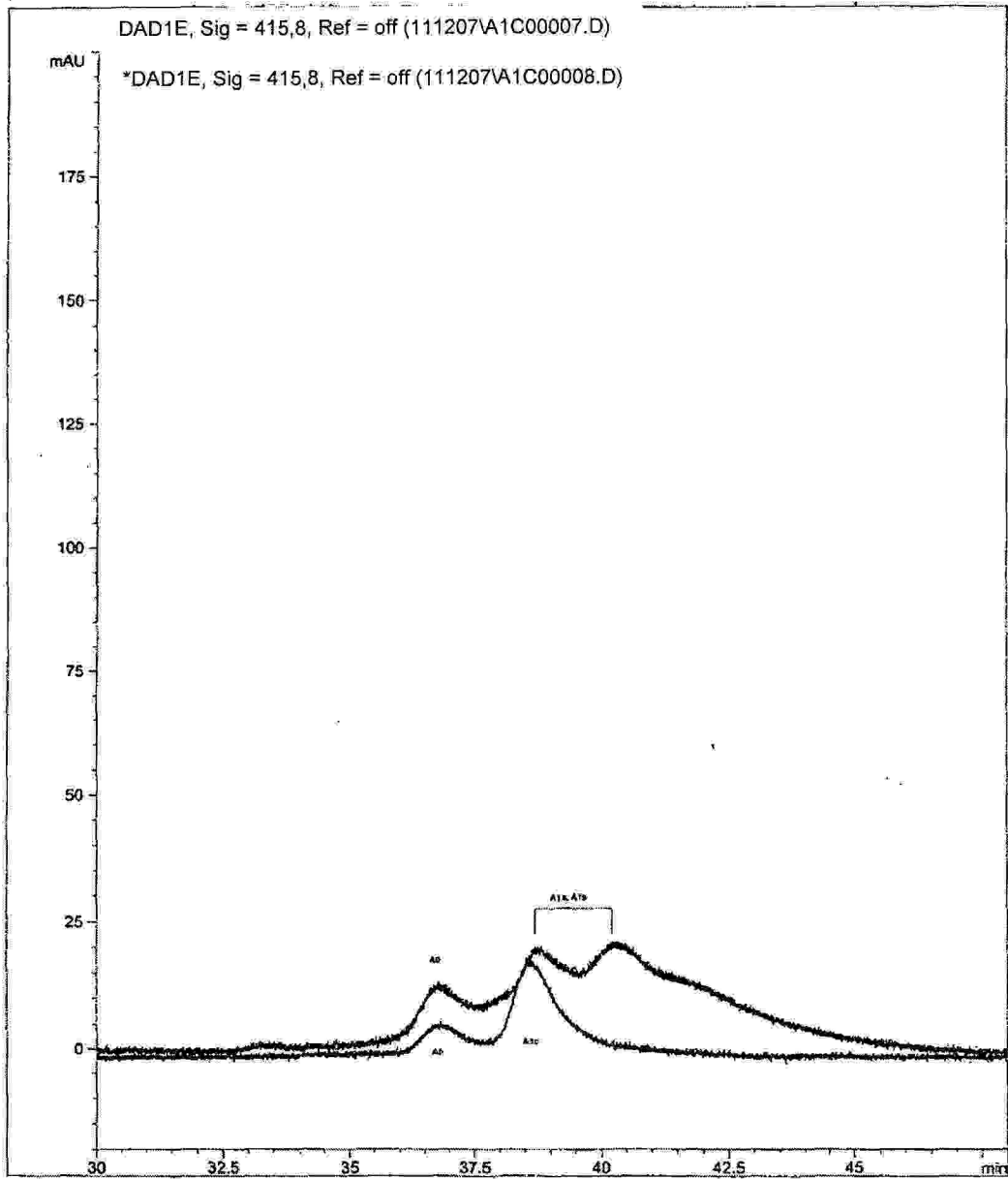
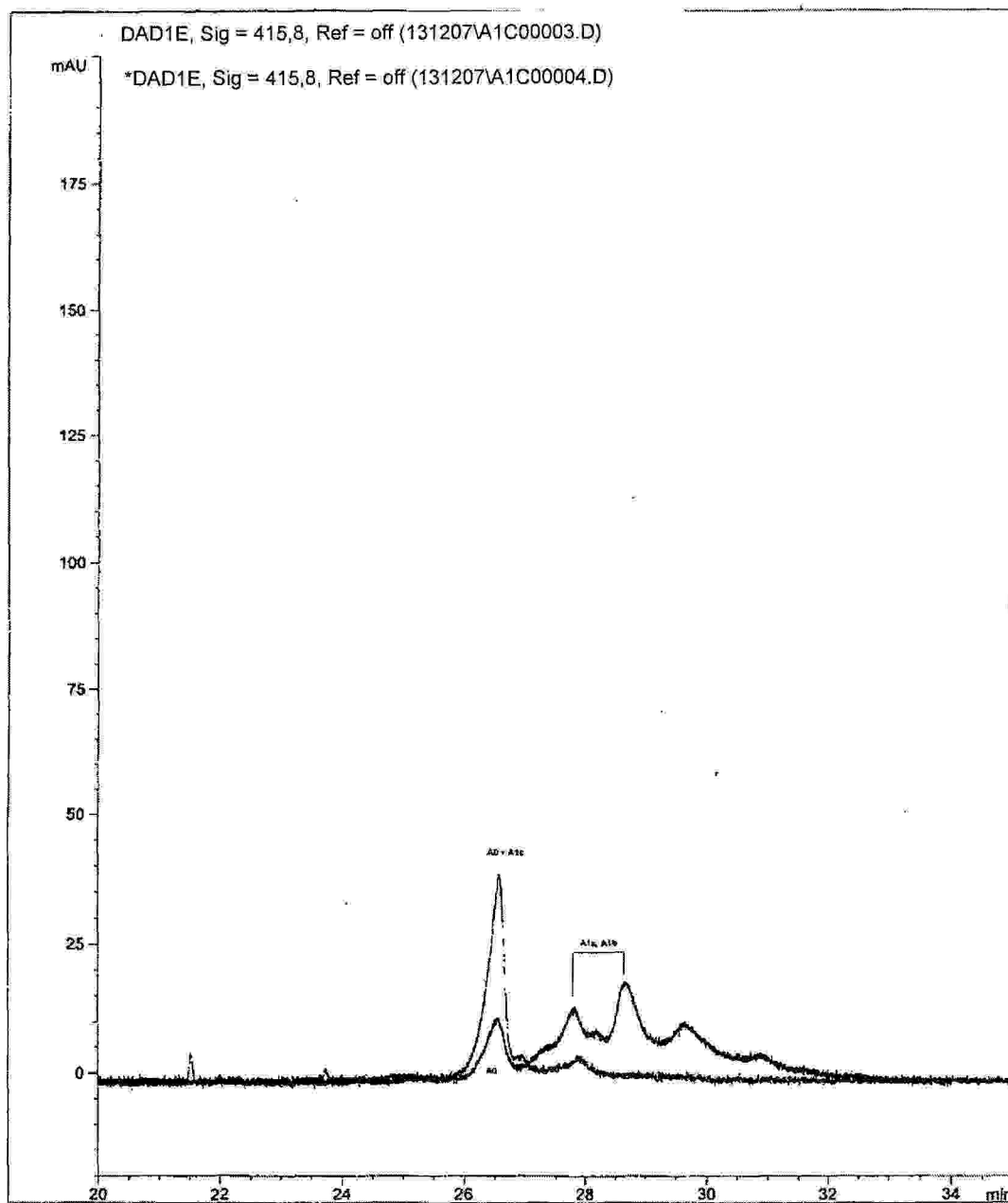


Fig.2

Eletroferograma(s) Atual(is)

**Fig.3**

Eletroferograma(s) Atual(is)

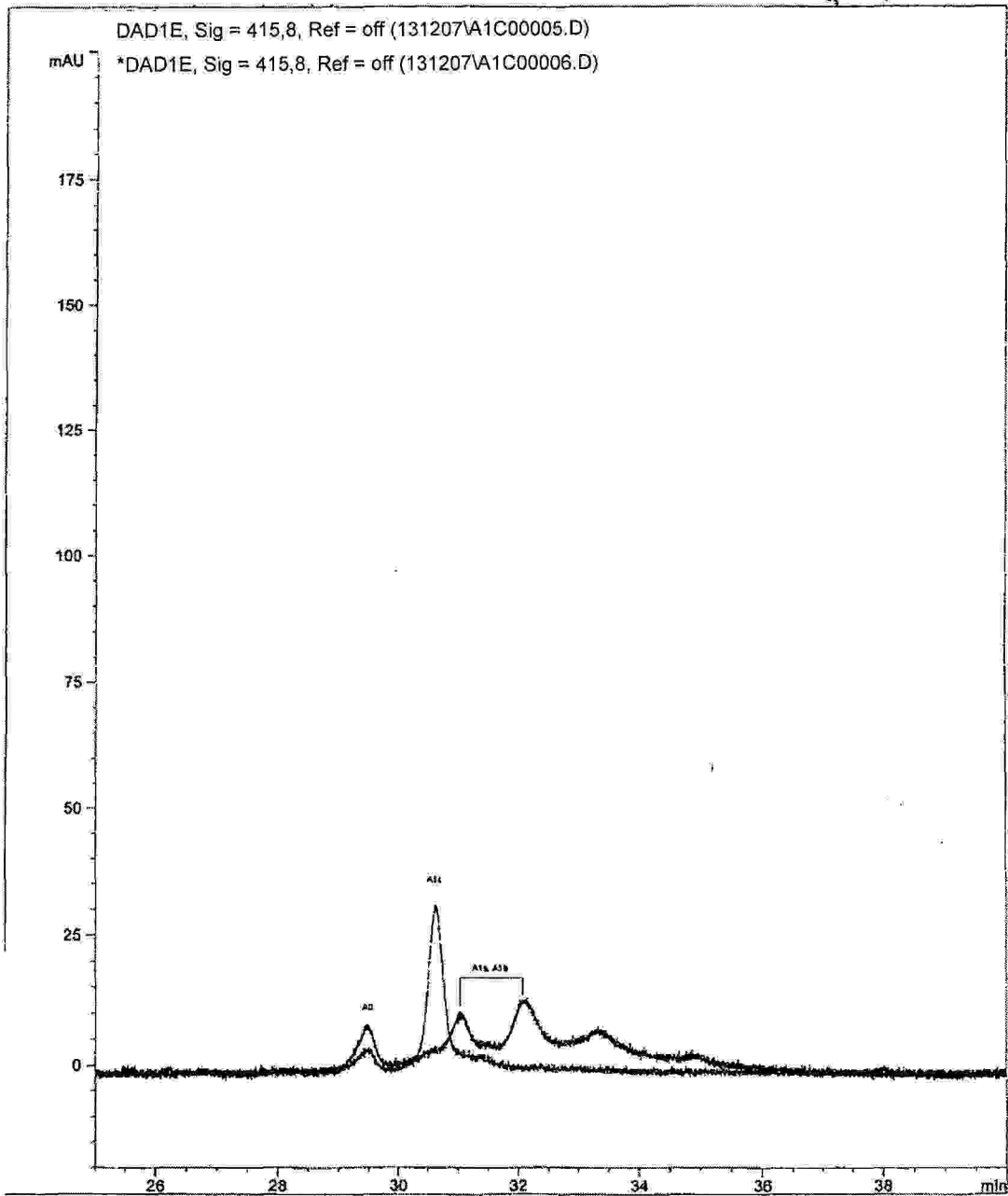
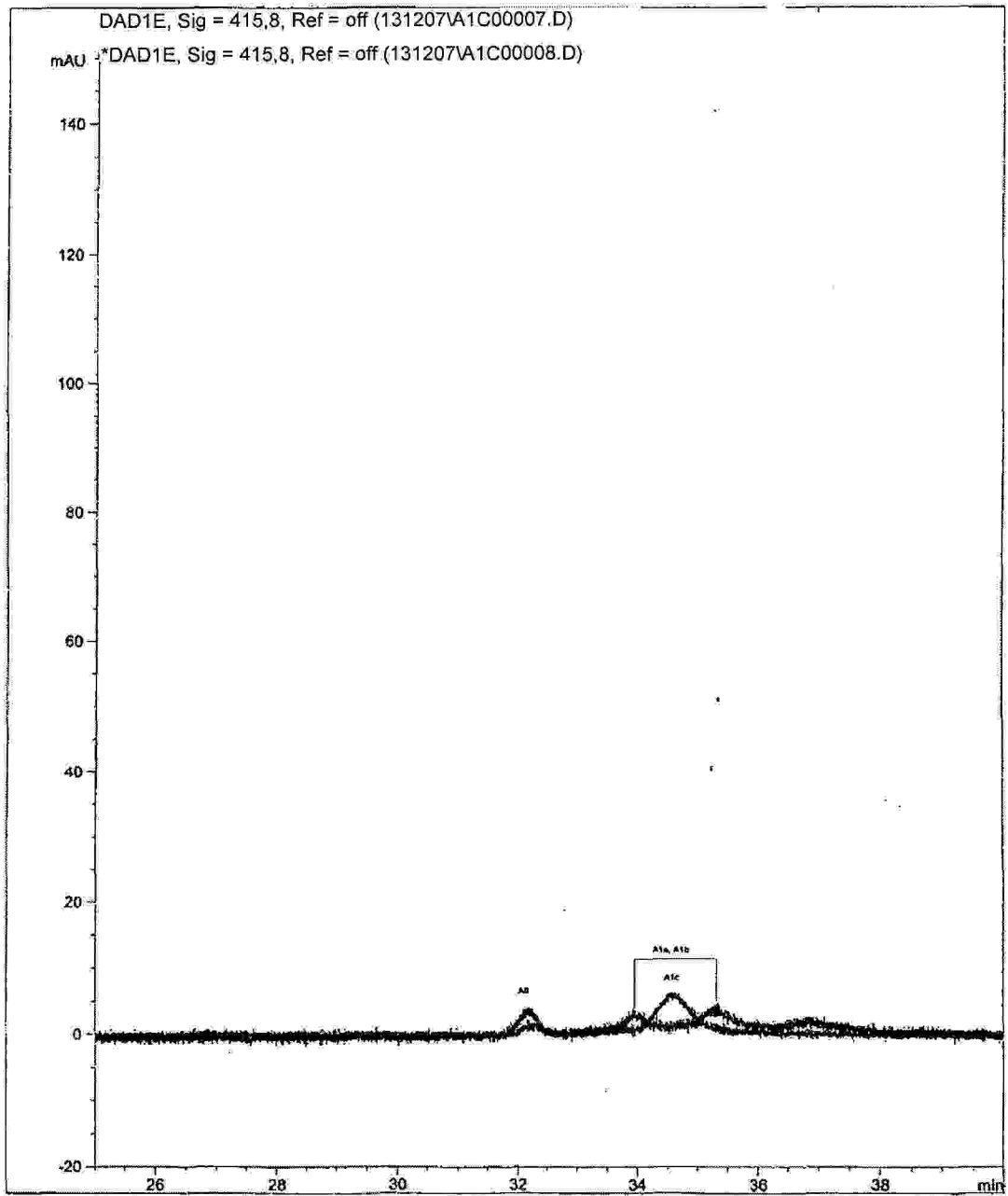


Fig.4

Eletroferograma(s) Atual(is)

**Fig.5**

Eletroferograma(s) Atual(is)

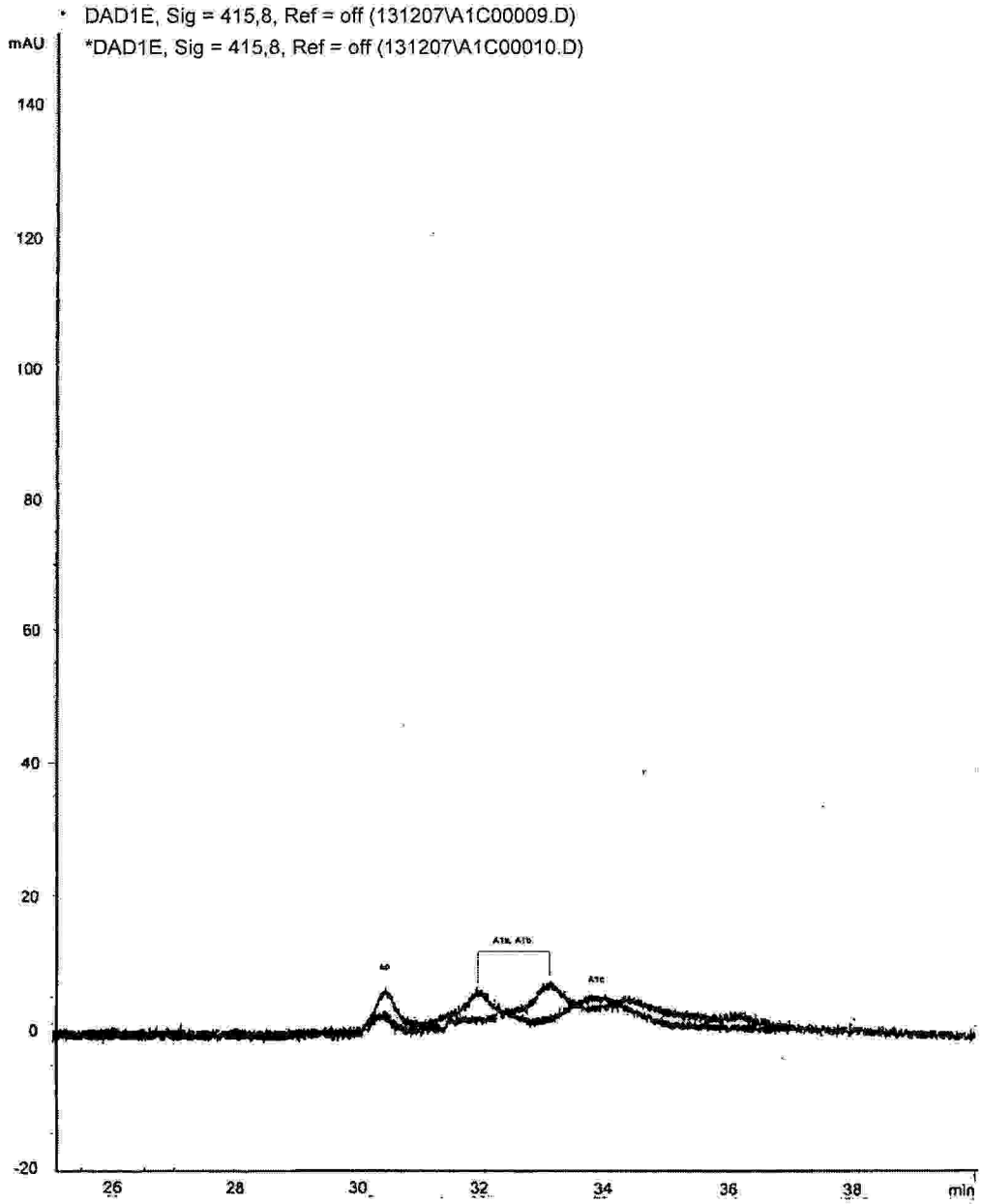
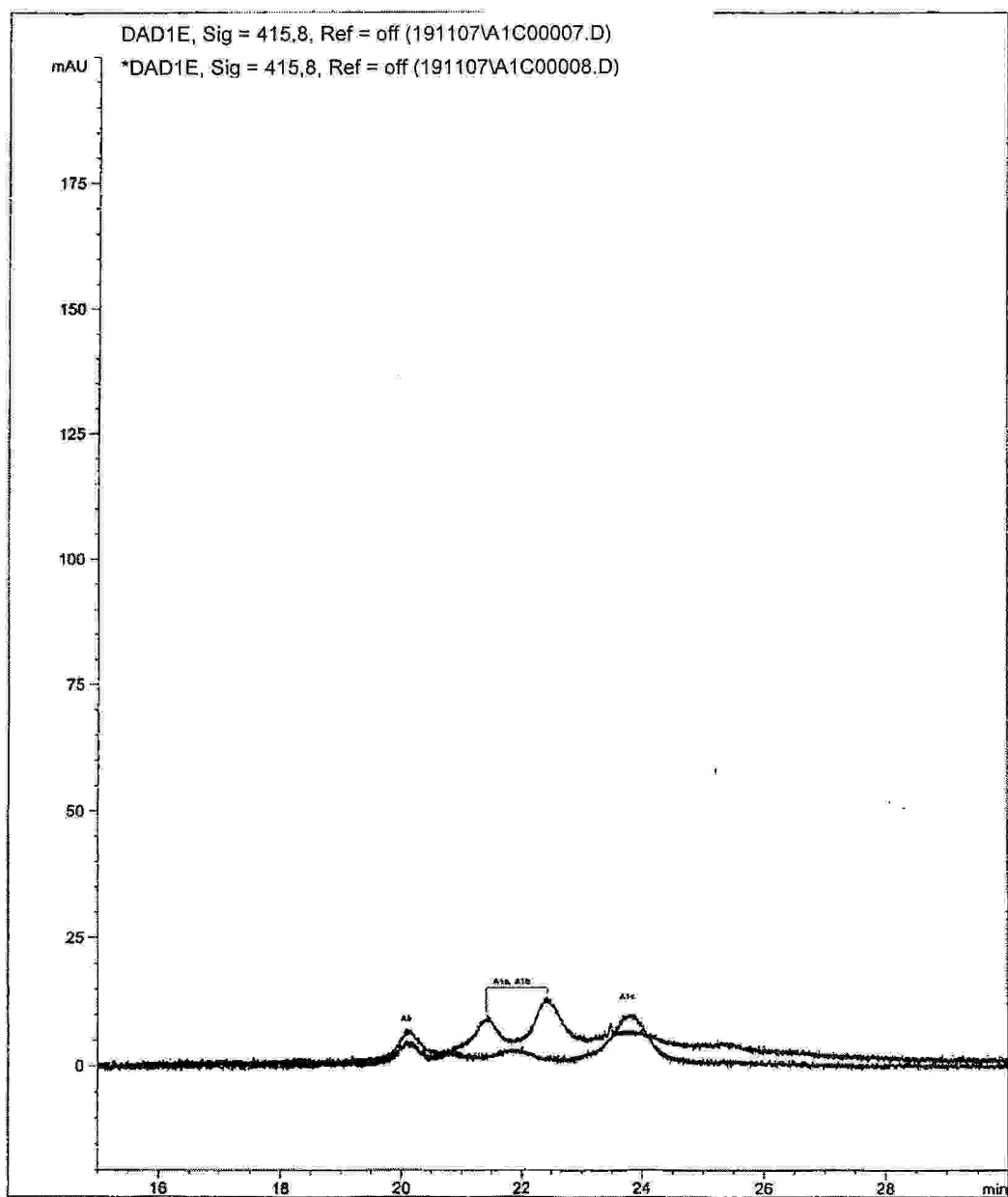


Fig.6

Eletroferograma(s) Atual(is)

**Fig.7**

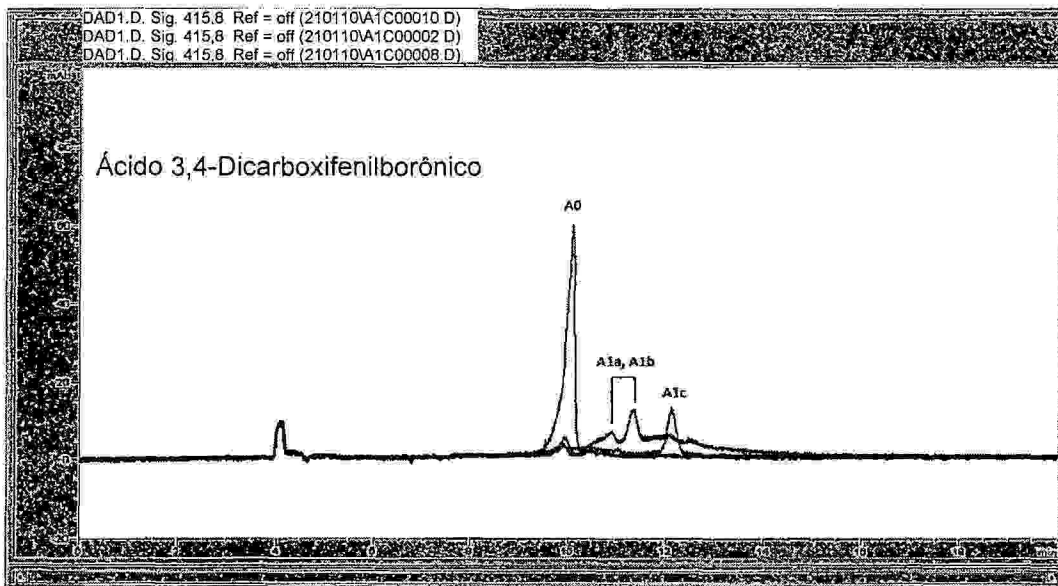


Fig.8

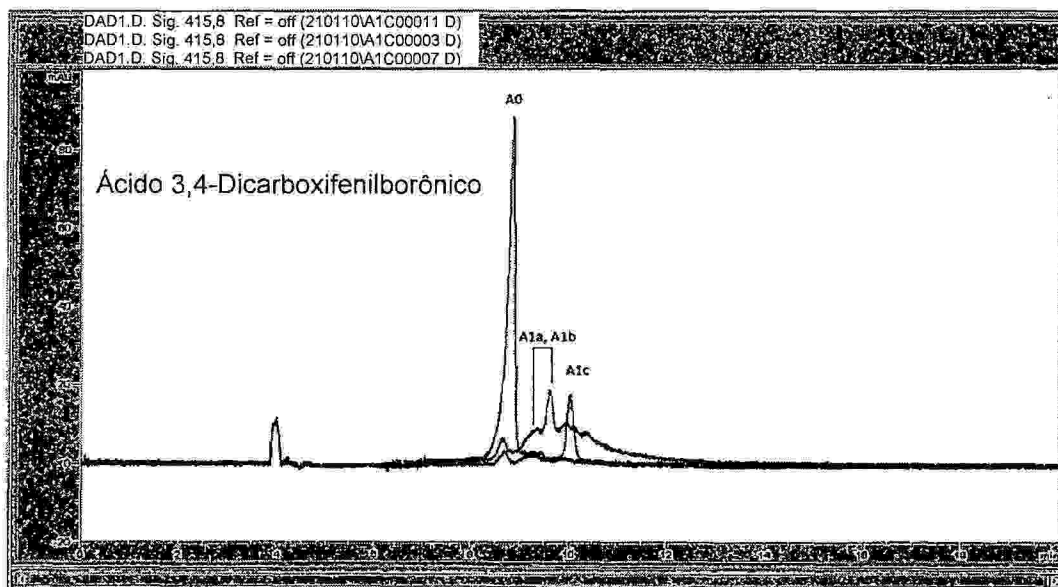


Fig.9

9/15

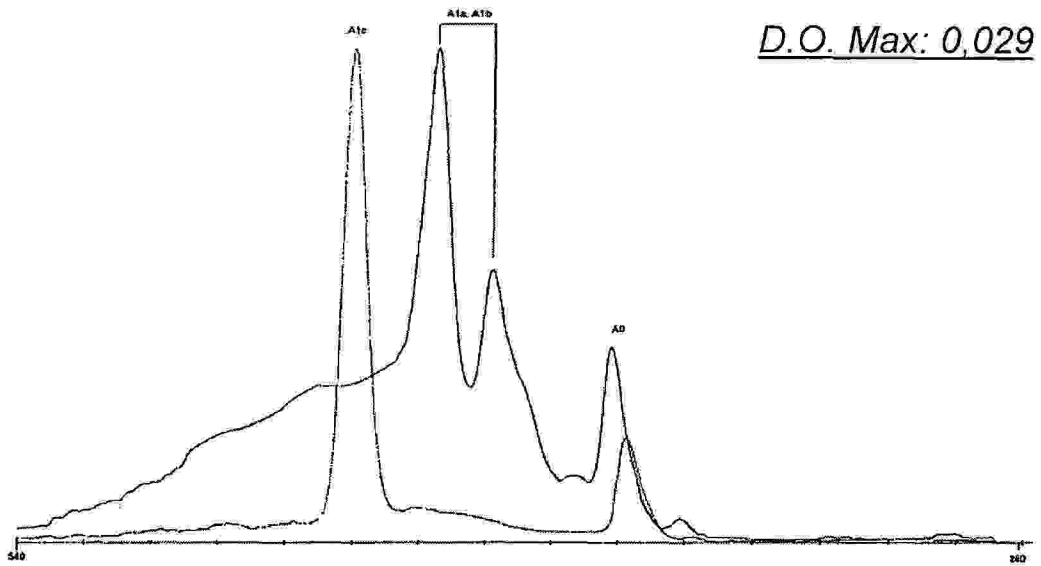


Fig.10

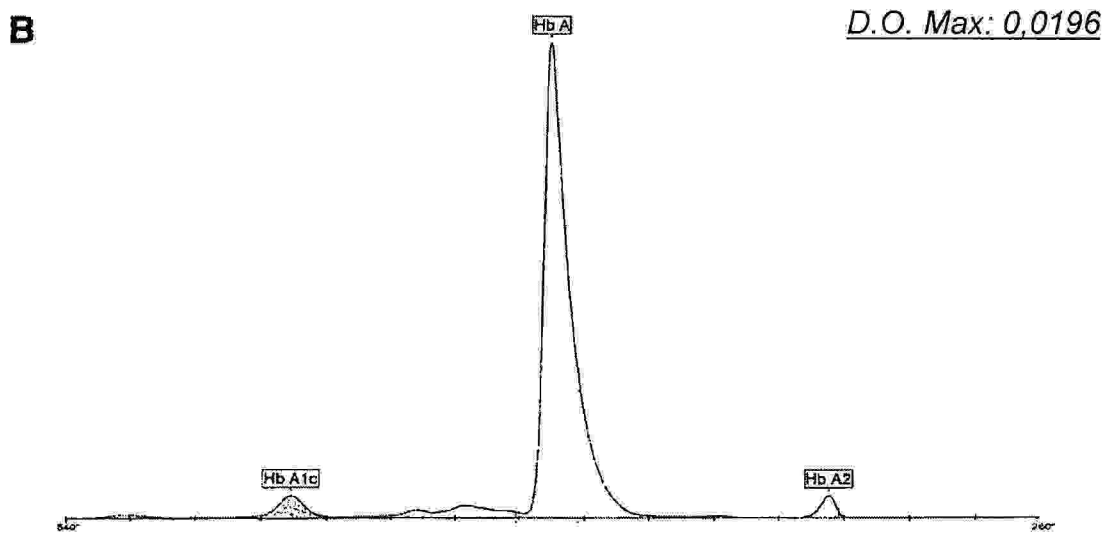
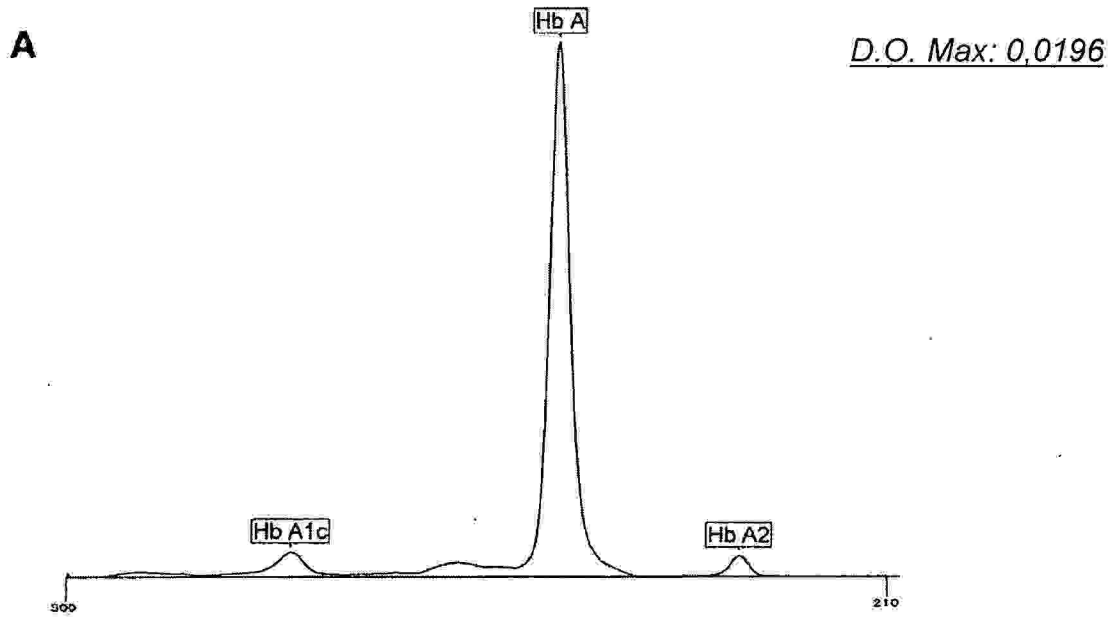
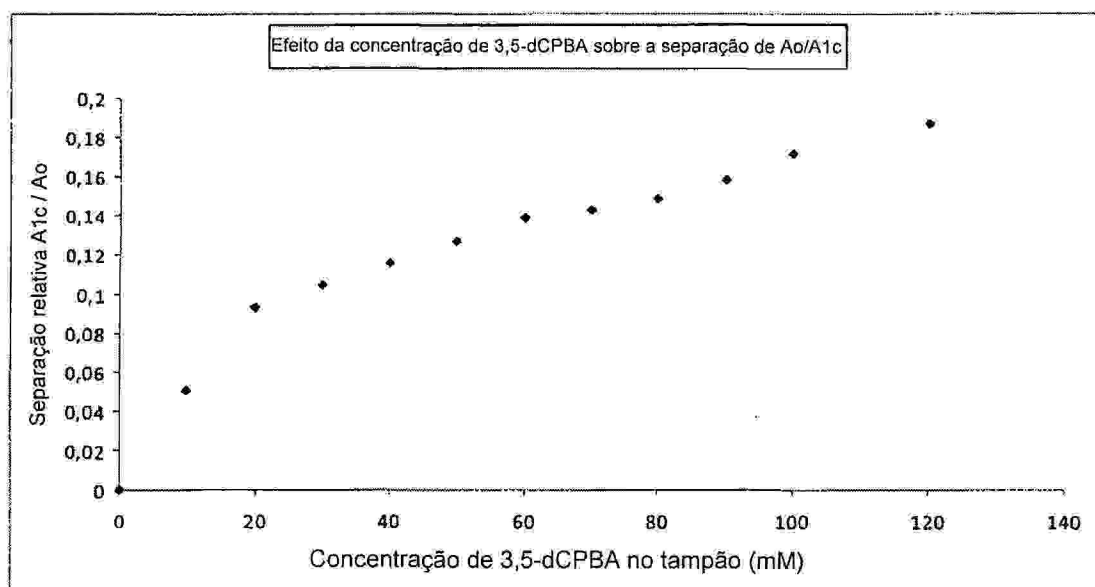


Fig.11

**Fig.12**

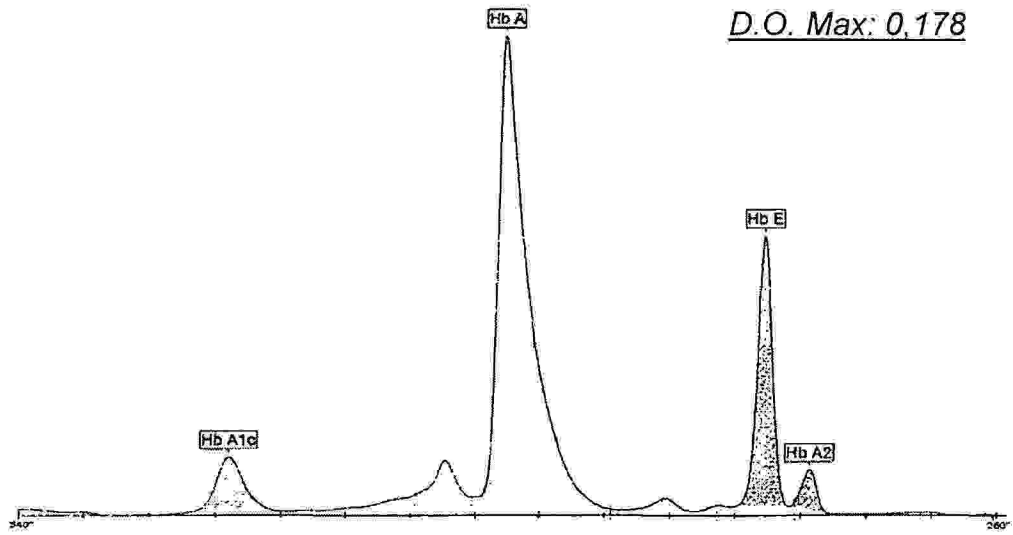


Fig.13

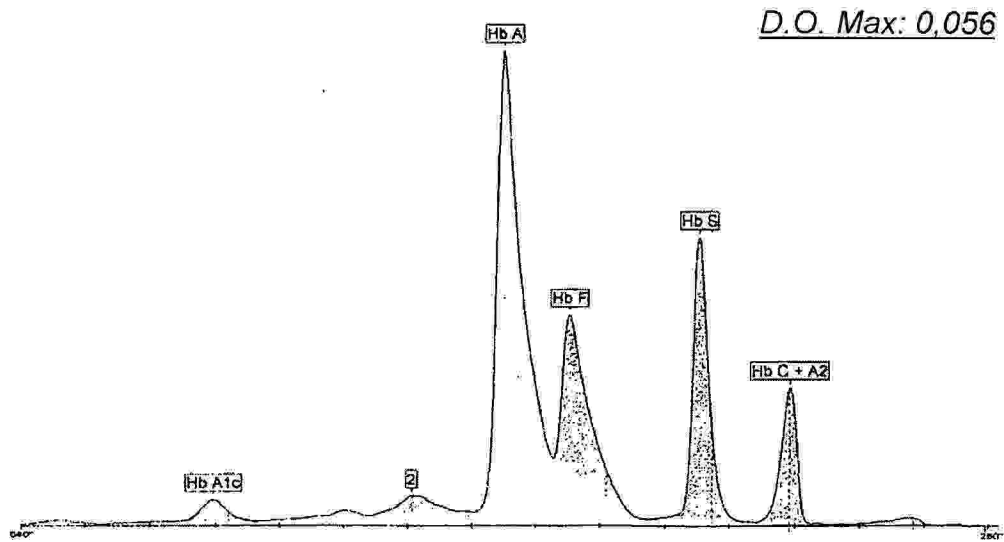


Fig.14

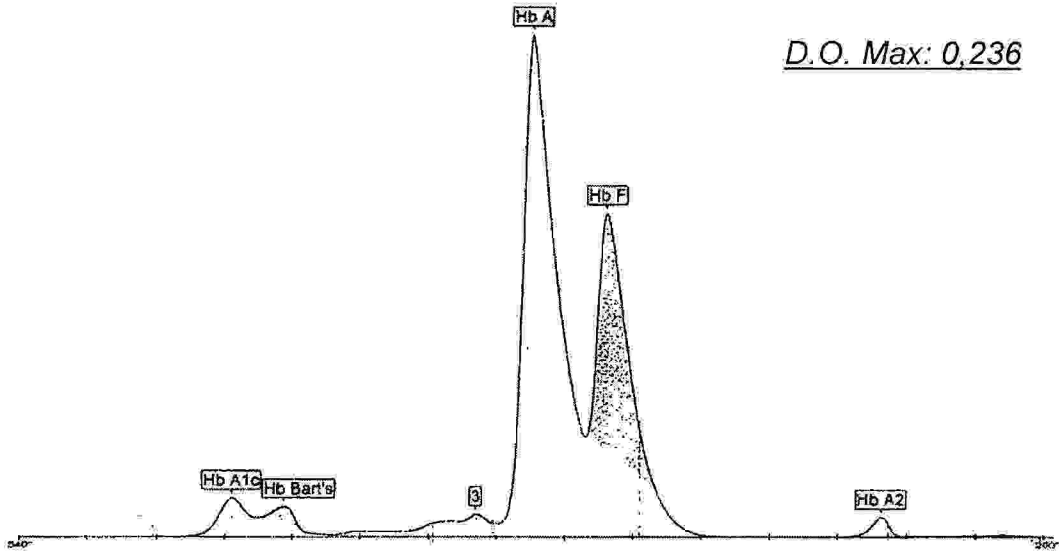


Fig.15

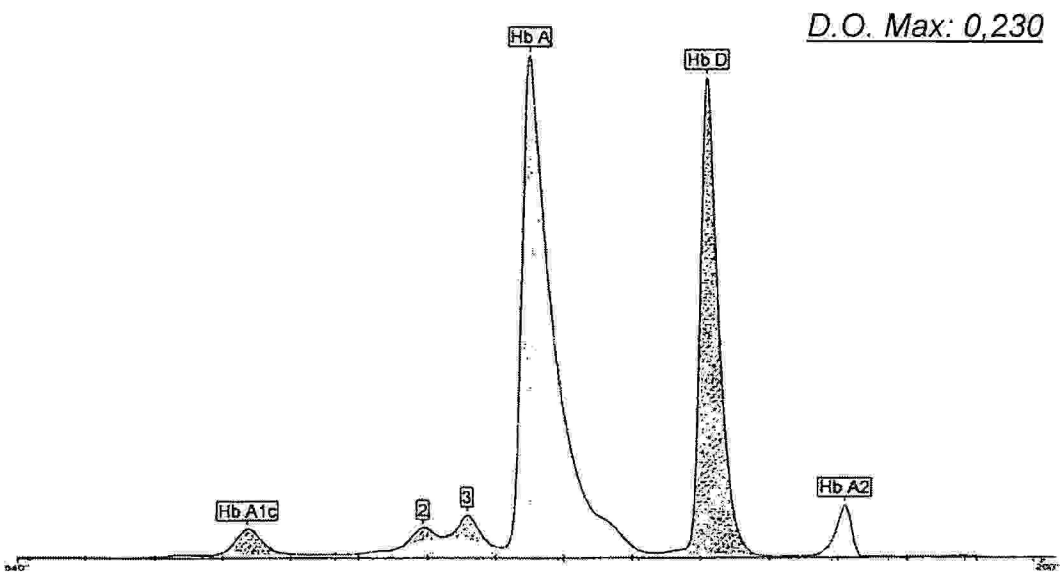


Fig.16

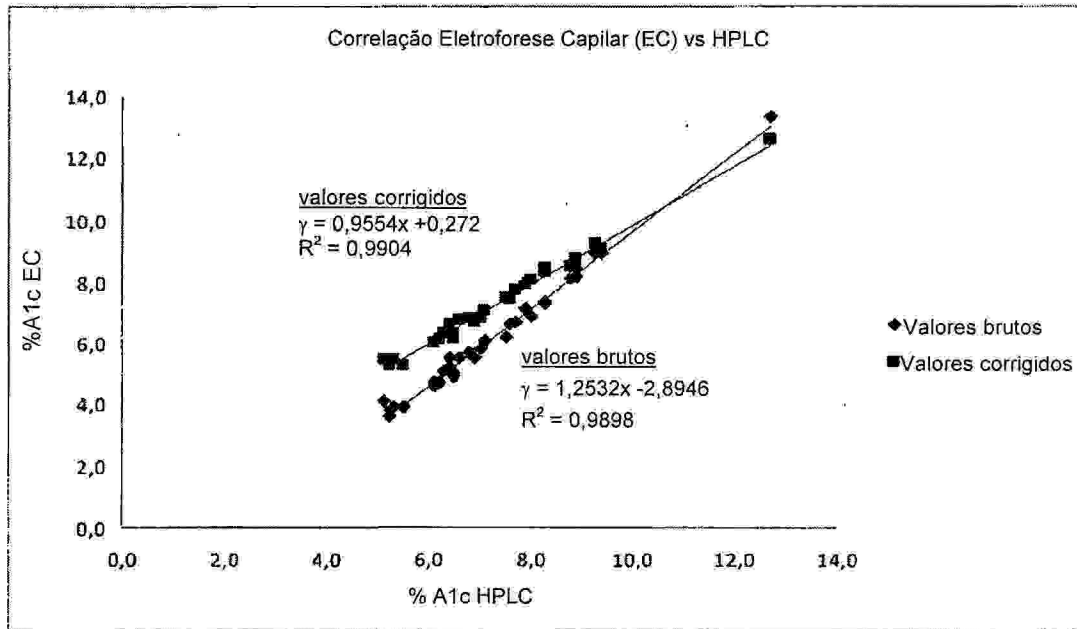
**Fig.17**

Fig. 18A

HYDRAGEL 15HD A1c



1 2 3 4 5 6 7 8 9

Fig. 18B

