

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 23.02.93.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 02.09.94 Bulletin 94/35.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *Société dite : PASTEUR SANOFI
DIAGNOSTICS — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : *Larue Catherine et Marquet Pierre-
Yves.*

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : *Cabinet Lavoix.*

⑤4 Composition stabilisée de troponine pour immunoessais et procédé de stabilisation de troponine pour immunoessais.

⑤7 L'invention a pour objet une composition stabilisée de troponine I ou T pour immunoessais, constituée d'une solution aqueuse contenant de la troponine I ou de la troponine T, 1 à 10 équivalents molaires de troponine C par équivalent molaire de troponine I ou T, et du CaCl₂, ainsi qu'un procédé de stabilisation d'une composition de troponine I ou T pour immunoessais consistant à ajouter de 1 à 10 équivalents molaires de troponine C par équivalent molaire de troponine I ou T.

FR 2 701 954 - A1



La présente invention concerne une composition stabilisée de troponine pouvant servir d'échantillon de référence dans les immunoessais visant à doser la troponine dans le sérum ou le plasma sanguin.

5 On sait que la troponine est un complexe protéique myofibrillaire, constitué de 3 protéines, les troponines C, I, T, qui permet la régulation de la contraction du muscle par le Ca^{2+} , contraction qui résulte de l'interaction de la myosine et de l'actine des
10 fibrilles musculaires.

 Lorsque le muscle est endommagé, que ce soit le muscle cardiaque, lors d'un infarctus du myocarde, ou le muscle squelettique, lors d'efforts physiques prolongés, les protéines contractiles alors libérées
15 apparaissent plus ou moins rapidement dans la circulation sanguine.

 Ainsi on a récemment préconisé le dosage des troponines pour le diagnostic précoce de l'infarctus du myocarde, que ce soit celui de la troponine T dans
20 Circulation 83 902-912 (1991) ou de la troponine I dans Am. Heart J 110 1333-44 (1987) et Molecular Immunology 29 (2) 271-278 (1992).

 Tout immunoessai enzymatique ou tout radioimmunoessai pratiqué dans les laboratoires d'analyses
25 biologiques implique, en général, la fourniture par le fabricant à côté des réactifs nécessaires au dosage, c'est-à-dire des anticorps marqués ou non, des agents de révélation et des solutions de dilution, d'un étalon du composé à déterminer qui, mis en oeuvre dans des condi-
30 tions analogues à celles de l'échantillon à étudier, servira de référence pour le calcul des résultats et/ou de témoin positif.

On sait que les protéines sont peu stables en solution, et les réactifs qui en contiennent sont fréquemment commercialisés sous forme lyophilisée, accompagnés d'un solvant, de composition convenable, dans lequel ils devront être dissous par l'utilisateur avant l'emploi; le maintien à 4°C des solutions obtenues permet de les utiliser pendant plusieurs jours, même si l'étalonnage journalier montre une certaine évolution des concentrations du réactif; en général, et c'est ce qui est préconisé pour la troponine T, les solutions de référence préparées à partir du lyophilisat sont congelées, en dose unitaire.

Les solutions aqueuses tamponnées de troponine, notamment celles de troponine I et T, peuvent être conservées plusieurs mois à -80°C, mais on a constaté qu'elles n'étaient pas stables plus de quelques heures à + 4°C, même si des inhibiteurs de protéases ou des agents antibactériens, y étaient ajoutés, ce qui oblige les laboratoires d'analyses biologiques à préparer fréquemment, quelquefois deux fois par jour, leurs solutions d'étalonnage.

La présente invention permet la conservation durant plusieurs jours à + 4°C, des solutions étalons plus ou moins diluées de troponine I ou de troponine T qui servent de référence dans des immunoessais spécifiques.

La composition stabilisée de l'invention comprend en milieu aqueux l'une des deux troponines I ou T selon le dosage à effectuer et de 1 à 10 équivalents molaires de troponine C et de préférence de 2 à 5 équivalents, ainsi qu'une grande quantité de chlorure de calcium. La quantité de CaCl_2 peut être de 100 à 10000 fois en poids celle de la troponine I ou de la troponine T.

La troponine C peut être d'origine humaine ou animale.

La concentration de troponine I ou T dans les solutions selon l'invention correspond à celles généralement utilisées dans les immunoessais, c'est-à-dire qu'elle peut être comprise entre 0,01 ng/ml et 1 µg/ml et de préférence entre 0,2 ng/ml et 25 ng/ml, tandis que la concentration de CaCl_2 qui n'est pas critique pourra être comprise entre 20 µM et 10 mM; de façon classique, cette concentration sera voisine de 2 mM.

La solution peut être tamponnée, de façon classique, à un pH compris entre 4 et 10, de préférence 5,5 et 7,5, et le solvant peut être constitué partiellement ou dans sa totalité de plasma humain normal, ce qui permet d'avoir un échantillon de référence de composition équivalente à celle de l'échantillon à étudier qui contient le plasma ou le sérum du malade.

L'invention a également pour objet une composition de troponine I ou T en poudre, de préférence sous forme lyophilisée, comprenant éventuellement du CaCl_2 et de 1 à 10 équivalents molaires de troponine C bien que dans ce cas la présence de troponine C ne sera utile pour assurer la stabilité des autres troponines qu'à partir du moment où la composition aura été mise en solution aqueuse par l'utilisateur.

La composition lyophilisée peut ne pas contenir de CaCl_2 , qui sera alors ajouté lors de la mise en solution.

L'invention a également pour objet un procédé de stabilisation d'une solution de troponine I ou T pour immunoessais, caractérisé en ce qu'il consiste à ajouter de 1 à 10 équivalents molaires de troponine C par équivalent molaire de troponine I ou T, et du CaCl_2 .

Dans ce qui suit, on décrit des exemples de réalisation de l'invention et les résultats des essais

de conservation correspondants.

La troponine I (TnI) humaine a été isolée d'un coeur par la méthode décrite dans FEBS Lett. 40 253-257 (1974). La solution obtenue peut être conservée plusieurs mois à -80°C, à une concentration supérieure à 10 µg/ml dans un tampon phosphate salin contenant 0,5% de caséine.

La troponine T (TnT) peut être obtenue comme décrit dans J. Biochem. 72, 723-735 (1972) ou dans J. Biol. Chem. 249 4742-4748 (1974).

La troponine C (TnC) peut être isolée par la méthode décrite dans Acta Chem. Scand. B 42; 211-215 (1988) à partir du complexe des 3 troponines (T, C, I), d'origine bovine, qui est commercialisé.

Les concentrations des solutions préparées sont déterminées à l'aide du réactif de Bradford, décrit dans Ann. Biochem 72, 248 (1976) et commercialisé; le produit de référence est un mélange de troponine I, C et T, connu, commercialisé par la société Sigma sous forme lyophilisée avec la réf. T 4895.

Préparation de la composition selon l'invention

- Composition contenant 5 molécules de troponine C par molécule de troponine I.

On introduit dans 940 µl de tampon KH_2PO_4 (0,1 M; pH 6,8) contenant 10% de plasma humain normal, 276 µg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 µl de solution de troponine I à 10 µg/ml et 50 µl de solution troponine C à 10 µg/ml.

Il est préférable d'effectuer ces opérations en milieu stérile en utilisant des solutions de troponine I et de troponine C stérilisées, par exemple en leur faisant traverser un filtre de diamètre de pores 0,22 µm.

La solution obtenue de concentration en TnI voisine de 100 ng/ml et TnC de 500 ng/ml est utilisée ensuite pour préparer une gamme de dilutions de 1 ng/ml

à 10 ng/ml en troponine I.

- On prépare de la même façon des solutions contenant 1 ou 2 ou 10 équivalents molaires de troponine C par rapport à la troponine I.

5 La composition en poudre pourra être obtenue par lyophilisation d'une composition aqueuse préparée comme précédemment en l'absence de plasma humain.

On prépare de façon analogue des solutions contenant de 1 à 10 équivalents molaires de troponine C par rapport à la troponine T, en remplaçant la troponine I par la troponine T.

10

Réalisation des essais

Les solutions conservées à 4°C sont dosées aux jours choisis, pendant 6 semaines, en utilisant comme référence une gamme étalon, préparée extemporanément, à partir de la solution de troponine I conservée à -80°C.

15

Le dosage est effectué avec deux anticorps monoclonaux dirigés contre la troponine I myocardique; le premier anticorps est adsorbé sur les parois de tubes pour immunoessais commercialisés par NUNC (USA) sous la référence Maxisorp, Startube; le second anticorps est marqué à la peroxydase; la méthode est dite méthode sandwich.

20

L'obtention de ces anticorps est décrite dans Molecular Immunology 29 (2) 271-278 (1992). On a constaté qu'il n'y a pas d'interférence dans ce dosage avec les autres isoformes de troponine I, la troponine C ou les autres protéines myocardiques.

25

En l'absence de TnC, dès le premier jour de conservation, on observe une diminution sensible de la concentration en TnI pour les différentes dilutions; si la TnC est remplacée par de l'actomyosine ou par de la tropomyosine, à raison de 5 équivalents molaires par rapport à la TnI, la concentration de TnI mesurée au bout

30

35

de 12 jours n'est plus que les 2/3 de celle du départ à 10 ng/ml alors que les solutions stabilisées par la TnC et CaCl_2 n'ont pas évolué.

- 5 Au bout de 40 jours, les solutions de TnI, stabilisées par différentes concentrations de TnC et CaCl_2 n'ont pas évolué, tandis que les solutions non stabilisées ont une concentration apparente qui peut chuter jusqu'à 80%.

REVENDEICATIONS

1. Composition stabilisée de troponine I ou T pour immunoessais, caractérisée en ce qu'elle est constituée d'une solution aqueuse contenant de la troponine I ou de la troponine T, 1 à 10 équivalents molaires de troponine C par équivalent molaire de troponine I ou T, et du CaCl_2 .

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle contient une quantité de CaCl_2 égale à 100 à 10000 fois, en poids celle de la troponine I ou de la troponine T.

3. Composition selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce qu'elle comprend de la troponine I et 2 à 5 équivalents molaires de troponine C par équivalent molaire de troponine I.

4. Composition selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est en solution aqueuse tamponnée à pH compris entre 4 et 10.

5. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que le milieu de dilution est constitué jusqu'à 100% de plasma humain.

6. Composition selon l'une des revendications 3 à 5, caractérisée en ce que la concentration en troponine I est comprise entre 0,01 ng/ml et 1 $\mu\text{g/ml}$ et ce que la concentration de CaCl_2 est comprise entre 20 μM et 10 mM.

7. Composition en poudre pour la préparation d'une composition stabilisée selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle contient de la troponine I ou de la troponine T, 1 à 10 équivalents molaires de troponine C par équivalent molaire de troponine I ou T et éventuellement du CaCl_2 .

8. Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle est sous forme lyophilisée et exempte de CaCl_2 .

9. Procédé de stabilisation d'une composition aqueuse de troponine I ou T pour immunoessais, caractérisé en ce qu'il consiste à ajouter de 1 à 10 équivalents molaires de troponine C par équivalent molaire de troponine I ou T, et du CaCl_2 .

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il consiste à ajouter une quantité de CaCl_2 , de préférence égale à 100 à 10000 fois en poids celle de la troponine I ou de la troponine T.

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 483345
FR 9302067

PRELIMINAIRE

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY vol. 259, no. 15, 10 Août 1984 pages 9544 - 9548 R.H.INGRAHAM ET AL. 'Binary Interactions of Troponin Subunits' * abrégé *	1-10
A,D	AMERICAN HEART JOURNAL vol. 113, no. 6, 1987 pages 1333 - 1344 B.CUMMINS ET AL. 'Cardiac-specific troponin-I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction.' * page 1333 - page 1335 *	1-10
A,D	CIRCULATION vol. 83, no. 3, Mars 1991 pages 902 - 912 H.A.KATUS ET AL. 'Diagnostic Efficiency of Troponin T Measurements in Acute Myocardial Infarction' * page 902 - page 903 *	1,2,4, 57-10
A,D	FEBS LETTERS vol. 40, no. 2, Avril 1974 pages 253 - 257 H.SYSKA ET AL. 'A new method of preparation of troponin I (inhibitory protein) using affinity chromatography. Evidence for three different forms of troponin I in striated muscle.' * page 253 *	1-10
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.5)
		G01N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
26 Octobre 1993		HITCHEN, C
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

PRELIMINAIRE
N° d'enregistrement
national
FA 483345
FR 9302067

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A,D	ACTA CHEMICA SCANDINAVICA vol. B42 , 1988 pages 211 - 215 E.THULIN ET AL. 'Purification of Rabbit Skeletal Muscle Troponin C.' * le document en entier * -----	1,8
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.C1.5)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
26 Octobre 1993		HITCHEN, C
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1
EPO FORM 1503 03.92 (P04C13)