



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 339 561**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/545 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05012151 .6**
96 Fecha de presentación : **15.12.1997**
97 Número de publicación de la solicitud: **1591789**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.11.2005**

54 Título: **Procedimiento para la mejora de la recuperación de troponina I y T.**

30 Prioridad: **18.12.1996 US 769077**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.05.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.05.2010

73 Titular/es: **Biosite Incorporated**
9975 Summers Ridge Road
San Diego, California 92121, US

72 Inventor/es: **Buechler, Kenneth F. y**
McPherson, Paul H.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 339 561 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la mejora de la recuperación de troponina I y T.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un dispositivo para inmunoensayos para mediciones y para troponina T.

10 **Antecedentes de la técnica**

10 El infarto de miocardio es una de las principales causas de muerte en los Estados Unidos. Aproximadamente 5 millones de individuos que experimentan dolor torácico son evaluados cada año en hospitales a lo largo de Estados Unidos, sin embargo, posteriormente se encuentra que menos del 30% de estos individuos han tenido un infarto de miocardio. La diagnosis exacta y rápida de un infarto de miocardio es importante tanto para el paciente que sufre un infarto de miocardio como para el sistema de salud que puede minimizar los costos en los que se incurre identificando rápidamente los individuos que no necesitan tratamiento.

20 La diagnosis de un infarto de miocardio se realiza normalmente en el departamento de emergencias de un hospital. Un individuo, que tiene síntomas de infarto de miocardio, es tratado de maneras diferentes dependiendo de la evidencia de la afección. Generalmente, se realiza un electrocardiograma para valorar la afección del corazón; sin embargo, aproximadamente el 50% de los pacientes que experimentan un infarto de miocardio tienen un electrocardiograma no diagnóstico. Entonces, el médico se encuentra con un problema de diagnosticar y tratar al paciente sospechoso de tener un infarto de miocardio. De esta manera, la diagnosis y el tratamiento son difíciles para pacientes sospechosos de sufrir un infarto de miocardio que tienen electrocardiogramas no diagnósticos.

25 La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha instituido directrices para diagnosticar un infarto de miocardio que exponen que un individuo debe exhibir dos de los tres criterios siguientes: 1) tener dolor torácico o un historial de enfermedad cardíaca; 2) un electrocardiograma diagnóstico; y, 3) creatina quinasa (CK) o isoenzima de creatina quinasa MB (CKMB) elevada. De esta manera, para el 50% de los individuos que se presentan en los hospitales por una sospecha de infarto de miocardio y que tienen un electrocardiograma no diagnóstico, el médico debe depender de los síntomas de dolor torácico y una CK o una CKMB elevada para diagnosticar un infarto de miocardio.

30 El ensayo de CK o CKMB es realizado generalmente en laboratorios de hospitales usando instrumentación sofisticada. Los ensayos incluyen inmunoensayos y ensayos de enzimas que detectan la actividad o la masa de CK o CKMB presente en las muestras de sangre.

40 Durante un infarto de miocardio, las células del músculo cardíaco mueren y liberan sus contenidos al torrente sanguíneo. La CKMB es liberada entre dichos componentes celulares. La CKMB se incrementa por encima de un valor nominal normal y puede ser diagnóstico para un infarto de miocardio. La especificidad de CKMB para diagnosticar un infarto de miocardio no es del 100% ya que otra fuente de CKMB en el cuerpo es el músculo esquelético. Debido a que la masa del músculo esquelético en el cuerpo excede con creces la masa del músculo cardíaco, durante la regeneración catabólica normal de las células del músculo esquelético, la concentración de CKMB en la sangre en individuos sanos variará. En general, la concentración de CKMB que puede ser indicativa de un infarto de miocardio es superior a 5-7 ng/ml (Circulation 87, 1542-1550 (1993), Clin. Chem. 39, 1725-1728 (1993)). La concentración de CKMB de individuos que tienen una lesión del músculo esquelético o que han hecho ejercicio se ha informado que se eleva valor superior a 9 ng/ml (Clin. Chem. 38, 2396-2400 (1992)). Por lo tanto, el problema de la especificidad, cuando se usa CKMB como un marcador para un infarto de miocardio, ha provocado la búsqueda para otros marcadores más específicos que son liberados sólo desde el músculo cardíaco dañado.

50 Se ha demostrado recientemente que la troponina I y la troponina T son más específicos que la CKMB para diagnosticar un infarto de miocardio (Circulation 83, 902-912 (1991), Clin. Chem. 40, 1291-1295 (1994), aunque la troponina T tiene algunas desventajas como marcador debido a que es elevada en pacientes que experimentan enfermedad renal (Clin. Chem. 41, 312-317 (1995)). El uso de troponina I como un marcador diagnóstico para un infarto de miocardio parece cumplir también muchos de los requerimientos clínicos (Clin. Chem. 40, 1291-1295 (1994), Clin. Chem. 41, 312-317 (1995)).

60 El documento WO 96/33415 divulga procedimientos para mejorar la recuperación de troponina I y/o troponina T añadiendo troponina C a una muestra que se supone que comprende troponina I y/ troponina T. La unión de troponina I y/o troponina T de, por ejemplo, membranas, filtros o recipientes es considerablemente reducida por la formación de complejos con troponina C, que tienen una tendencia reducida a ser absorbidas en dichas superficies comparadas con los monómeros de troponina respectivos.

65 El documento WO 93/24231 divulga dispositivos de ensayo que comprenden al menos dos superficies opuestas dispuestas separadas por una distancia capilar, al menos una de las cuales es capaz de inmovilizar al menos un conjugado o un ligando objetivo.

El complejo de troponina en un músculo comprende troponina I, C y T. Estos componentes de troponina existen como isoformas específicas de varios tejidos. La troponina C existe como dos isoformas, una de músculo cardíaco

y de contracción lenta y una de músculo de contracción rápida. Las troponinas I y T se expresan como isoformas diferentes en el músculo de contracción lenta, de contracción rápida y cardíaco (Biochem. J. 171, 251-259 (1978), J. Biol. Chem. 265, 21247-21253 (1990), Hum. Genet. 88, 101-104 (1991), Circul. Res. 69, 1226-1233 (1991)). Las isoformas cardíacas únicas de troponina I y T les permiten ser distinguidas inmunológicamente de las otras troponinas del músculo esquelético. Por lo tanto, la liberación en la sangre de troponina I y T, desde el músculo cardíaco dañado, se ha relacionado con casos de angina inestable e infarto de miocardio. La técnica anterior, sin embargo, no ha abordado otras formas de troponina I y T en la sangre.

El complejo de troponina en el músculo está unido estrechamente al aparato contráctil. Aproximadamente el 6% de la troponina T en el tejido cardíaco existe como una proteína no unida en el citoplasma y se cree que este depósito de troponina T es liberado desde el músculo dañado (Am. J. Cardiol. 67, 1360-1367 (1991)).

Las conformaciones de troponina I, T y C cambian tras unirse cuando forman complejos binarios y ternarios (Biochemistry 33, 12800-12806 (1994), J. Biol. Chem. 254, 350-355 (1979), Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 16, 535-559 (1987)). Una comprensión de los cambios conformacionales de la troponina I y la troponina T y la heterogenicidad de las proteínas en la sangre es crítica para el desarrollo de procedimientos de diagnóstico exactos para medir concentraciones de troponina I y troponina T. Además, se ha informado de que la troponina I es inestable en la sangre (Direction Insert for Troponin I Immunoassay, Sanofi/ERIA Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, Francia), y los mecanismos responsables de la inestabilidad no se han comprendido. La presente invención proporciona un novedoso dispositivo de inmunoensayo que tiene una respuesta de ensayo fraccionario mejorada.

Divulgación de la invención

Se divulga un dispositivo de inmunoensayo tal como se define en las reivindicaciones 1 a 5.

Modos de realizar la invención

Definiciones

Tal como se usan en la presente memoria, un “anticuerpo” o “proteína receptora” se refieren a un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un fragmento de unión de un anticuerpo, un anticuerpo recombinante o una proteína receptora que se une específicamente a un objetivo. La unión específica a una sustancia significa la cualidad de esa sustancia por la que la sustancia tenderá a no unirse a algo a lo que no se une específicamente; por el contrario, la sustancia tendrá mayor afinidad por algo a lo que se une específicamente que por algo a lo que no se une específicamente.

Tal como se usa en la presente memoria, un anticuerpo insensible en un inmunoensayo es un anticuerpo que para cada forma de troponina de interés proporciona un valor de respuesta de ensayo que es el mismo dentro de aproximadamente un factor de 2, y preferentemente el mismo dentro de aproximadamente el 20%, que los valores de respuesta de ensayo para las otras formas de interés. De esta manera, un anticuerpo insensible es uno que exhibirá una detección de más de una forma de troponina en un inmunoensayo.

Tal como se usa en la presente memoria, un anticuerpo sensible en un inmunoensayo es uno que para una forma o un grupo de formas de troponina proporciona un valor de respuesta de ensayo que es al menos aproximadamente un factor 2 superior, y preferentemente, aproximadamente un factor de 5 superior, que los valores de respuesta de ensayo para otras formas. De esta manera, un anticuerpo sensible es uno que exhibirá una detección preferente de una forma o un grupo de formas de troponina en un inmunoensayo.

Tal como se usan en la presente memoria, las nueve formas de troponina son: 1) el complejo ternario cardíaco; 2) el complejo binario de troponina cardíaca de I(oxidada)T; 3) el complejo binario de troponina cardíaca de I(reducida)T; 4) el complejo binario de troponina cardíaca de I(oxidada)C; 5) el complejo binario de troponina cardíaca de I(reducida)C; 6) el complejo binario de troponina cardíaca T/C; 7) la troponina I cardíaca no unida (oxidada); 8) la troponina I cardíaca no unida (reducida); y, 9) troponina T cardíaca no unida.

Tal como se usa en la presente memoria, una “zona” es un concepto que se correlaciona con la capacidad para identificar distintas señales sensibles. Por lo tanto, una zona puede corresponder a una región geográfica o puede corresponder a la capacidad de identificar separadamente distintas señales sensibles. Las señales sensibles pueden ser distintas en virtud de, pero sin limitarse a, variaciones entre las características siguientes: longitud de onda de fluorescencia y reflectancia o absorbencia óptica; tiempo de vida de, o energía de transición entre, estados electrónicos; potenciales de oxidación-reducción; características colorimétricas; o, tipo de señal (por ejemplo, fluorescencia vs. radioactividad vs. absorbencia óptica).

Tal como se usa en la presente memoria, la troponina no unida es troponina que no está en un complejo. Un complejo de troponina puede ser binario o ternario.

Tal como se usa en la presente memoria, una “etiqueta”, “generador de señal” o “elemento generador de señal” es una entidad que puede tomar un número de formas diferentes: enzimas y sus efectos resultantes sobre un sustrato, partículas metálicas coloidales, partículas de sílice u látex con tinte incorporado, y partículas de tinte son ejemplos de generadores de señal. Una enzima puede reaccionar sobre un sustrato para producir un producto que es sensible, por

ejemplo, en virtud de la longitud de onda de fluorescencia (por ejemplo, ultravioleta, visible, infrarrojo) o sensible por efecto del pH.

Modos

Esta invención está dirigida, en conexión con el dispositivo de la invención, al ensayo de la troponina I y la troponina T y los complejos de estas proteínas en fluidos corporales, particularmente, en plasma, suero y sangre humana. La presencia de troponina I y T cardíaca en la sangre, sobre una concentración nominal, es diagnóstica para un músculo cardíaco dañado. Las troponinas I y T existen en diversas conformaciones en la sangre, que pueden ser la misma o diferentes a sus conformaciones nativas en el tejido muscular. Estas diversas conformaciones de las moléculas de troponina pueden reaccionar de manera diferente con anticuerpos.

Las relaciones de la troponina I y T monomérica y los complejos binarios y ternario pueden relacionarse con el estado metabólico del corazón. En base a las reactividades de anticuerpos a la troponina I y T y a los complejos purificados de las troponinas, las concentraciones de troponina I y T y sus complejos pueden ser elucidadas ahora en muestras de sangre de pacientes que sufren un infarto de miocardio. Son preferentes los anticuerpos que reconocen la troponina I y T en las formas siguientes: 1) Las conformaciones de troponina I que tienen cisteínas reducidas y oxidadas intramolecularmente; 2) Los complejos binarios de troponina I y T, de troponina I y C, de troponina T y C; y 3) El complejo ternario de troponina I, T y C. Además, se describen procedimientos para la recuperación mejorada de troponina I y T en inmunoensayos.

El foco sobre la troponina I y T para uso como marcadores para infarto de miocardio se ha basado en parte a su tamaño molecular: debido a que las proteínas son relativamente pequeñas, se cree que se escapan de células dañadas más rápidamente que las proteínas más grandes.

Anticuerpos para complejos de troponina y para troponina I y T

El término "anticuerpos o proteínas receptoras", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a anticuerpos monoclonales y policlonales, fragmentos de unión de anticuerpos, y proteínas receptoras que se unen específicamente a un objetivo. En un aspecto de la solicitud, las proteínas receptoras, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión, están dirigidas a los epítomos de troponina I que son insensibles al estado de oxidación de la molécula. Los términos sensible e insensible, en la presente memoria, se refieren generalmente a la capacidad de un anticuerpo para reconocer formas particulares de troponina libre o complejos de troponina. En particular, un anticuerpo sensible que es útil en un inmunoensayo distingue una forma o unas formas de troponina de otra forma y un anticuerpo insensible que es útil en un inmunoensayo no distingue una forma o unas formas de troponina de otra. La sensibilidad o insensibilidad de un anticuerpo es exhibida en un inmunoensayo. Para determinar si un anticuerpo es sensible o insensible, el anticuerpo es ensayado con cada forma de troponina independientemente para proporcionar la respuesta de ensayo del anticuerpo para cada forma de troponina. En general, un anticuerpo preferente que es insensible a la forma de troponina proporcionará una respuesta de ensayo que es igual, dentro de aproximadamente un factor de dos y preferentemente dentro del 20%, para cada forma de troponina. Un anticuerpo preferente que es sensible a la forma de troponina proporcionará una respuesta de ensayo que es al menos un factor de dos, y preferentemente un factor de cinco, mayor para una forma o un grupo de formas comparado con las otras formas. Además, los términos "troponina I y T" pueden hacer referencia a las troponinas libres no complejadas o a las troponinas en los complejos binarios o ternario. La troponina I cardíaca humana contiene dos cisteínas, en las posiciones 80 y 97 (FEBS Letters, 270, 57-61 (1990)). En la técnica actual, durante la purificación de troponina I de los tejidos, el estado de oxidación de la troponina I es dirigido hacia la forma reducida usando varios reductores, incluyendo mercaptoetanol, ditiotreitól y similares (Can. J. Biochem. 54, 546-553 (1976), Methods Enzymol. 85, 241-263 (1982)). Tras la purificación, la técnica actual enseña también a mantener la troponina I en la forma reducida para prevenir la formación de disulfuro intermolecular (J. Biol. Chem. 258, 2951-2954 (1983)).

En el desarrollo de inmunoensayos para una proteína objetivo, la proteína objetivo purificada actúa como un estándar con el que se valora la sensibilidad y la especificidad del inmunoensayo, usando los anticuerpos que han sido seleccionados. Tal como se divulga en la presente memoria, las cisteínas en la troponina I pueden oxidarse rápidamente, intramolecularmente, para alterar la conformación de la proteína. El grado de oxidación de la troponina I no ha sido abordado previamente con respecto a su efecto sobre el procedimiento del inmunoensayo. Las enseñanzas descritas en la presente memoria muestran que una inestabilidad aparente en la molécula de troponina I está relacionada con las dinámicas de la reducción y la oxidación intramolecular de la molécula de troponina I. Además, se enseña la selección de anticuerpos para la cuantificación exacta de troponina I en la sangre.

La troponina I reducida, purificada experimenta una oxidación intramolecular de las cisteínas, cuya tasa no depende de la concentración de troponina I. Debe tenerse especial cuidado cuando se prepara la forma oxidada de troponina I, especialmente en presencia de varios agentes reductores tiol, debido a la posibilidad de formar disulfuros mixtos de la proteína y el reactivo tiol reductor. La forma disulfuro mezclada de la proteína puede no comportarse como la forma reducida u oxidada de la molécula, especialmente si los anticuerpos usados en el inmunoensayo se unen a la región de la proteína que rodea las cisteínas 80 y 97.

Usando preparaciones purificadas de troponina I oxidada y reducida, se observaron efectos diferenciales en los inmunoensayos usando varios anticuerpos creados para troponina I. Con algunos pares de anticuerpos, la troponina I

reducida era difícilmente detectable en los inmunoensayos, mientras que con otros pares, el estado de oxidación no tenía efectos sobre el procedimiento de inmunoensayo. Estos resultados mostraron que la selección de anticuerpos para la molécula de troponina I, sin conocimiento previo del estado de oxidación de la troponina I, puede resultar en anticuerpos y un procedimiento de inmunoensayo que proporciona resultados erróneos. Esta conclusión se ejemplifica mediante inmunoensayos de troponina I a partir de pacientes que padecen infarto de miocardio. El grado de oxidación de la troponina I en las muestras de pacientes es variable y sugiere una posible base para las inestabilidades aparentes de los ensayos de troponina I de la técnica actual. La troponina I libre cambia su estado de oxidación de la forma reducida a la oxidada con el tiempo (véase el Ejemplo 4).

En el caso cuando un inmunoensayo, que comprende un anticuerpo insensible, va a ser utilizado para la unión a la troponina libre o complejada, un anticuerpo preferente es uno que sea insensible respecto a las formas oxidada, reducida y complejada, ya que la troponina circulante en la sangre puede cambiar su estado de oxidación y el grado de unión a otros componentes de troponina con el tiempo. Por ejemplo, si se libera troponina I libre, reducida, desde el corazón, ésta puede transformarse a la forma oxidada durante la circulación en la sangre y hasta que la troponina es medida. Además, las troponinas I y T libres en la sangre pueden unirse, una a la otra, y a la troponina C para formar complejos binarios y ternario. El resultado de estas transformaciones a la forma oxidada de la troponina I o a complejos de troponina es que cuando un anticuerpo es seleccionado para un inmunoensayo que es sensible con respecto a las formas oxidada y reducida y formas complejas, el ensayo mostrará un incremento o decremento aparente en la concentración de troponina con el tiempo dependiendo de qué forma (libre, oxidada o reducida o complejada) reconoce mejor el anticuerpo, en vez de un cambio real en la concentración de troponina. En otro ejemplo, la liberación de complejos de troponina desde un músculo cardíaco dañado puede resultar en la formación de formas binarias y libre (sin formar complejos) de troponina I y T durante la circulación en la sangre o hasta que la troponina es valorada. La variabilidad de los resultados de ensayo de las concentraciones de troponina usando inmunoensayos que comprenden un anticuerpo o unos anticuerpos sensibles puede despistar a un médico, haciéndole creer que una afección de un paciente está mejorando o empeorando.

En el caso cuando un inmunoensayo que comprende más de un anticuerpo sensible es usado para medir la troponina libre o complejada, se desea que cada anticuerpo sensible reaccione con una forma o un grupo de formas de troponina, de manera que el anticuerpo exhiba una respuesta de ensayo máxima para la forma o las formas deseadas y una respuesta de ensayo mínima para todas las otras formas. Los anticuerpos preferentes son unos para los cuales las respuestas de ensayo para las formas deseadas son aproximadamente las mismas, preferentemente dentro del 20%, para todos los anticuerpos sensibles y dichas respuestas mínimas de ensayo son al menos un factor de 2 y preferentemente un factor de 5 veces menores que las respuestas de ensayo máximas. Por ejemplo, si dos diferentes anticuerpos son usados para anticuerpos señal en un inmunoensayo, y un anticuerpo es insensible con respecto a la troponina I (o la troponina T) libre oxidada y reducida y exhibe una respuesta de ensayo máxima para dichas formas libres de troponina y una respuesta de ensayo mínima para la troponina complejada, entonces el otro anticuerpo debería exhibir una respuesta de ensayo máxima para la troponina complejada y una respuesta de ensayo mínima para las formas I y T de troponina libre. De esta manera, puede determinarse una medición exacta de la troponina total. Una persona con conocimientos en la técnica reconocerá también que los anticuerpos con afinidades diferentes, es decir, que exhiben respuestas de ensayo diferentes, para las formas de troponina, pueden ser utilizados en inmunoensayos cuando cada forma de troponina es medida sola o en zonas discretas y que la desviación relativa de los inmunoensayos puede tomarse en cuenta en la calibración del ensayo. También, los anticuerpos sensibles e insensibles pueden ser fijados a fases sólidas para medir cada forma de troponina en zonas discretas.

En otro aspecto de la solicitud, anticuerpos o fragmentos de unión que están dirigidos a los epítomos de la troponina I o T son insensibles con respecto a la troponina I o T libre y los complejos de troponina. Los anticuerpos que son sensibles con respecto a la troponina I o T libre y los complejos de troponina proporcionan procedimientos para la estimación de la extensión de unión de la troponina I o T complejada. Usando preparaciones purificadas de troponina I, T y C, y los complejos de troponina purificada, se enseñan los efectos de la troponina I o T que se une en complejos sobre el reconocimiento de la troponina por pares de anticuerpos y se relaciona al estado dinámico de la troponina I o T en la sangre.

El grado de unión de la troponina I y T a los componentes del complejo de troponina o a otras proteínas del aparato contráctil, incluyendo tropomiosina y actina, en la sangre puede ser también problemático para los inmunoensayos, dependiendo del grado y la afinidad de la unión. En sus formas nativas, el complejo de troponina existe en el músculo cardíaco y en músculo esquelético de contracción lenta y rápida como un complejo ternario de troponina I, C y T. La troponina I y T del músculo esquelético tiene secuencias de aminoácidos diferentes que la troponina I y T del músculo cardíaco, respectivamente; sin embargo, la troponina C de músculo de contracción lenta tiene la misma secuencia de aminoácidos que la proteína del músculo cardíaco (Nature 271, 31-35 (1978), Arch. Biochem. Biophys. 186, 411-415 (1978), FEBS Lett. 292, 5-8 (1991)). La troponina C de músculo esquelético de contracción rápida, aunque no idéntica a la troponina C cardíaca, puede unirse a la troponina I cardíaca (Biochemistry 33, 8464-8471 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 9036-9040 (1993)).

La liberación de componentes de troponina, es decir, troponina I, C y T, o componentes del aparato contráctil, por ejemplo, tropomiosina y actina, del músculo esquelético, debido a la regeneración normal de las células del músculo esquelético, puede resultar en una cantidad considerable de troponina y componentes del aparato contráctil en la sangre. Debido a que la masa del músculo esquelético es mucho mayor que la masa del músculo cardíaco, los componentes de troponina presentes en la sangre de un individuo normal puede derivarse en su mayor parte del músculo

esquelético. Los componentes de troponina en circulación que son derivados principalmente del músculo esquelético se unirían a la troponina I y T cardíaca que son liberadas en la sangre durante un infarto de miocardio o eventos que conducen a la creación de músculo cardíaco dañado. Conforme progresa el daño muscular en un individuo, los componentes de troponina derivados del tejido cardíaco se incrementarán presumiblemente en la sangre. De esta manera, la concentración de componentes de troponina (unidos y libres) en la sangre, de individuos que experimentan un infarto de miocardio, puede ser derivada diferencialmente de ambos músculos cardíaco y esquelético.

La forma de troponina liberada del corazón, bien libre o bien como complejos binarios o ternario, en la sangre puede indicar una afección particular del corazón. Los ensayos mostrados en la presente memoria prevén el análisis de patrones de liberación que pueden permitir al médico diagnosticar un fallo específico del corazón, por ejemplo, angina inestable en comparación con un infarto de miocardio o para determinar el tiempo desde que ocurrió un infarto.

El impacto clínico de un inmunoensayo que mide solo la troponina I o T libre de un paciente que experimenta un infarto de miocardio puede ser muy importante. Debido a que la unión de la troponina I y T a componentes de troponina en la sangre será variable, dependiendo de las concentraciones de componentes de troponina, y del tiempo que ha transcurrido desde la liberación de los componentes de troponina desde el músculo, debe considerarse un análisis de la forma unida y libre de la troponina I y T en la sangre. Por ejemplo, la afinidad de unión de la troponina I a la troponina C, en presencia de calcio (que también está presente en la sangre) es $1,27 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (Biochemistry 33, 12729-12734 (1994)). Esto implica que si la concentración de troponina C es 100 ng/ml y la concentración total de troponina I (libre y unida) es 8 ng/ml, entonces la concentración de troponina I libre se calcula como 4,6 ng/ml. Si la concentración de troponina I, que es indicativa de un infarto de miocardio, es de 5 ng/ml o superior, entonces un ensayo que mide solo la forma libre de troponina I, en este caso, 4,6 ng/ml, indicará al médico que no ha habido un infarto de miocardio. Generalmente, en los departamentos de emergencias de los hospitales que admiten pacientes sospechosos de haber tenido un infarto de miocardio, se obtendrá de nuevo una muestra de sangre del individuo en una o dos horas después, si el primer resultado es negativo. En este ejemplo, el paciente, que tiene una concentración total de troponina I de 8 ng/ml en la primera muestra, (que se define como positiva para un infarto de miocardio), pero solo una concentración medida de 4,6 ng/ml, (que se definiría como un resultado negativo), no sería tratado y continuaría acumulando músculo cardíaco dañado durante el tiempo anterior a el análisis de una segunda muestra. La interpretación de los resultados de los ensayos de troponina I sufriría también la unión de la troponina T a los componentes del aparato contráctil en la sangre. De esta manera, los inmunoensayos de la técnica actual, que miden la troponina I y T libre, pueden no diagnosticar correctamente un infarto de miocardio cuando la concentración de troponina I o T, respectivamente, está cerca del punto de decisión. En algunos casos, el aumento o la disminución de la concentración de troponina I o T en la sangre de un paciente con el tiempo, tal como se determina mediante el análisis de muestras de sangre recogidas en diversos momentos diferentes, podrían ser usados para diagnosticar la afección dinámica del corazón, por ejemplo, para determinar si el corazón dañado está mejorando con la terapia o continua deteriorándose. En estos casos la evolución temporal de la concentración de troponina I o T libre podría ser diferente de la de la concentración de troponina total (unida y libre). Una persona con conocimientos en la técnica reconocerá que concentraciones crecientes de todos los componentes de troponina en la sangre resultarán en una fracción creciente de troponina I y T unida en relación a la troponina libre. La concentración total de troponina (unida y libre) puede aumentar más rápidamente que la concentración de troponina I y T libre. Un ensayo que mide la concentración total de troponina (troponina I y T unida y libre) sería más exacto en la valoración de la progresión del daño cardíaco en comparación con un ensayo que mide solo la troponina I o T libre.

En el dispositivo de la presente invención, los anticuerpos están dirigidos al complejo de troponina cardíaca. Específicamente, los anticuerpos están dirigidos a epítopos cardíacos específicos de troponina I y T del complejo de troponina o de los interfaces de troponina I/T, I/C, T/C en el complejo. Las enseñanzas en la presente memoria muestran que los anticuerpos creados para la troponina I y T pueden unirse escasamente a la troponina I o T del complejo ternario. Además, las enseñanzas en la presente memoria muestran que el complejo de troponina existe en la sangre de los pacientes que han experimentado un infarto de miocardio. Se describen también procedimientos que enseñan a una persona con conocimientos en la técnica a valorar la cantidad de complejo de troponina en la sangre en relación a la troponina I y T libre o complejos binarios de troponina I y T, usando anticuerpos que se unen a las moléculas de troponina libre.

El equilibrio entre los complejos binarios y ternario de troponina y troponina I y T libre se alterará durante el procedimiento de inmunoensayo debido a la unión de anticuerpos a los componentes de troponina y a los complejos. El cambio en las fracciones molares de las diversas especies durante el inmunoensayo puede ser considerable o despreciable y será una función de las concentraciones de anticuerpos, la afinidad de los anticuerpos para los complejos y los componentes de troponina, las constantes de asociación para los complejos y los componentes de troponina y el tiempo que se permite a los anticuerpos para unirse a la troponina. Estas variables pueden cambiar la concentración percibida de troponina I y T y conducir a conclusiones erróneas en relación a la concentración de troponina. Por ejemplo, si dos inmunoensayos utilizan diferentes pares de anticuerpos para realizar un inmunoensayo de tipo sándwich y sus concentraciones de anticuerpos y afinidades para troponina I o T son diferentes, y si una proporción de la troponina I o T ocurre en la muestra como complejos binarios y ternario, se puede esperar que cada inmunoensayo proporcionará un resultado diferente. Además, si las muestras de sangre contienen concentraciones variables de troponina C, entonces la proporción de troponina I y T que está unida a troponina C como un complejo binario perturbará diferencialmente cada inmunoensayo.

El complejo ternario de troponina es más estable en relación a la disociación que los complejos binarios de troponina.

En otro aspecto de la solicitud, los anticuerpos o fragmentos de unión están dirigidos a los epítomos que no son alterados mediante degradación proteolítica de la región N-terminal de la troponina I. También se ha informado de que la conformación de troponina I se ve afectada por fosforilación/desfosforilación (Biophys. J. 63, 986-995 (1992), Biochem. 33, 12729-12734 (1994)). En otra realización preferente, los anticuerpos o fragmentos de unión están dirigidos a los epítomos de cualquiera de entre troponina I o complejos de troponina I, que son alterados o no por medio del estado de fosforilación de la troponina I. La troponina I puede ser fosforilada usando los procedimientos descritos en J. Biol. Chem. 252, 851-857 (1977). Las preparaciones fosforiladas y desfosforiladas de troponina I pueden ser utilizadas como inmunógenos para generar anticuerpos así como antígenos para la selección de anticuerpos para la troponina I fosforilada y desfosforilada. El complejo de troponina puede ser disociado en las proteínas componentes usando varios tratamientos, incluyendo altas concentraciones de urea, bajo pH y agentes quelantes metálicos que se unen a cationes metálicos divalentes, particularmente calcio y magnesio (Methods Enzymol. 85, 241-263 (1982)). Estos tratamientos son, en general, muy rigurosos y requieren varias horas. De esta manera, estas condiciones para disociar el complejo de troponina son poco prácticas para inmunoensayos que deben realizarse en minutos sobre muestras de individuos que pueden estar sufriendo un infarto de miocardio.

La generación y la selección de anticuerpos, que son preferentemente o bien sensibles o bien insensibles a la unión de troponina I o T en complejos binarios, se consigue primero preparando complejos binarios de troponina I/T, T/C e I/C a partir de componentes purificados (J. Biol. Chem. 254, 350-355 (1979), J. Biol. Chem. 258, 2534-2542 (1983), J. Biol. Chem. 258, 2951-2954 (1983), Can. J. Biochem. Cell Biol. 63, 212-218 (1985), Biochemistry 33, 12729-12734 (1994), Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 16, 535-559 (1987)). Los complejos pueden ser estabilizados, si es necesario, reticulando químicamente las proteínas en el complejo usando procedimientos familiares para las personas con conocimientos en la técnica. La generación y la selección de anticuerpos, que son sensibles o insensibles a la unión de troponina I o T en el complejo ternario, pueden conseguirse en varias maneras. Por ejemplo, una manera es purificar el complejo ternario (Methods Enzymol. 85, 241-263 (1983)) o reconstituir el complejo usando los componentes de troponina purificados. Una persona con conocimientos en la técnica reconocerá que otras diversas proteínas del aparato contráctil que pueden ser asociadas con los complejos binarios o ternario de troponinas pueden ser construidas también a partir de los componentes purificados y que el complejo resultante puede ser utilizado para generar y seleccionar anticuerpos, tal como se enseña mediante la presente invención. El complejo puede ser estabilizado con respecto a la disociación reticulando químicamente los componentes. A continuación, los componentes purificados son inyectados, por ejemplo, en ratones o conejos, para generar anticuerpos monoclonales o policlonales. Otra manera es purificar troponina I o T libre (no unida) y, a continuación, inyectar la troponina I o T libre purificada, por ejemplo, en ratones o conejos, para generar anticuerpos policlonales o monoclonales. Una persona con conocimientos en la técnica reconocerá que hay muchos procedimientos disponibles para la producción de anticuerpos, por ejemplo, tal como se describe en Antibodies, A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, NY. Una persona con conocimientos en la técnica apreciará también que los fragmentos de unión de fragmentos Fab que imitan a anticuerpos pueden prepararse también a partir de información genética mediante varios procedimientos (Antibody Engineering; A Practical Approach (Borregaard, C., ed.), 1995, Oxford University Press, Oxford; J. Immunol. 149, 3914-3920 (1992)). En particular, la preparación, la exploración y la selección de fragmentos de unión recombinantes se describe en los Ejemplos 22 y 23.

Los anticuerpos que son generados son seleccionados primero explorando para afinidad y especificidad con los complejos binarios y ternario y comparando los resultados con la afinidad y especificidad de los anticuerpos con las moléculas de troponina I y T purificadas para las propiedades deseadas que son definidas por los procedimientos de inmunoensayo.

El procedimiento de exploración puede implicar la inmovilización de la troponina I o T purificada o los péptidos o los complejos binarios o ternario a secuencias cardíacas específicas de las troponinas en pocillos separados de placas de microtitulación. La solución que contiene un anticuerpo o grupos de anticuerpos potenciales es colocada, a continuación, en los pocillos de microtitulación respectivos y es incubada durante aproximadamente de 30 minutos a 2 h. Si un anticuerpo para la proteína de interés está presente en la solución, se unirá a la troponina inmovilizada. En la exploración de anticuerpos para unión a interfaces de complejos binarios o ternario de troponina, primero se selecciona un anticuerpo que se une al complejo binario o ternario inmovilizado en el pocillo de microtitulación. A continuación, ese anticuerpo es explorado adicionalmente para su capacidad para unirse a componentes de troponina libre; es decir, el anticuerpo de interfaz potencial no debería unirse a la troponina I, C o T libre, que está inmovilizada en los pocillos de microtitulación. Además, el anticuerpo de interfaz nunca debería ser capaz de formar un ensayo de tipo sándwich con complejos binarios o ternario y un anticuerpo que se sabe que se une a un componente de troponina específico en el complejo, en presencia de inhibidores de unión, que se sabe que alteran el complejo de troponina. Si se cumple esta última condición, entonces el anticuerpo de interfaz potencial tampoco debería ser capaz de formar un ensayo de tipo sándwich con el complejo de troponina y un anticuerpo a un componente de troponina diferente del que fue usado en la exploración previa, en presencia de inhibidores de unión. Si esta condición se cumple también, entonces un anticuerpo de interfaz ha sido seleccionado para un complejo binario. Debe realizarse un inmunoensayo adicional para seleccionar un anticuerpo de interfaz para un complejo ternario; es decir, si se cumplen las dos condiciones anteriores, entonces el anticuerpo de interfaz potencial tampoco debería ser capaz de formar un ensayo de tipo sándwich con el complejo de troponina y un anticuerpo a un componente de troponina diferente del que se usó en las dos exploraciones anteriores. A continuación, los pocillos de microtitulación son lavados y un anticuerpo secundario etiquetado (por

ejemplo, un anticuerpo anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina si los anticuerpos creados son anticuerpos de ratón) es añadido a los pocillos y se incuba durante 30 minutos y, a continuación, es lavado. Se añade sustrato a los pocillos y aparecerá una reacción de color donde está presente el anticuerpo para la troponina. Los anticuerpos que son de interés son analizados adicionalmente para afinidad y especificidad para las moléculas cardíacas específicas y para la complementariedad en la formación de complejos de tipo sándwich con los antígenos. Las personas con conocimientos en la técnica reconocerán que pueden tomarse muchos enfoques en la producción de anticuerpos o fragmentos de unión y la exploración y la selección para afinidad y especificidad para los diversos antígenos de troponina, pero estos enfoques no cambian el alcance de la invención.

10 *Ensayos para complejos de troponina y troponina I y T no complejada*

Un aspecto de la solicitud está dirigido al ensayo de troponina I y troponina T, particularmente inmunoensayos, en los que los anticuerpos seleccionados para el ensayo se unen a secuencias cardíacas específicas del complejo ternario, de los complejos binarios y de la troponina I o T no complejada (libre) con el fin de medir las fracciones complejadas (unidas) y libres de troponina I y T, respectivamente. Las secuencias cardíacas específicas de troponina I y T se describen en FEBS Lett. 270, 57-61 (1990) y Genomics 21, 311-316 (1994). Un péptido sintético compuesto de 14 aminoácidos que imita una secuencia cardíaca específica de troponina I y procedimientos usados para preparar anticuerpos para el péptido se describen en un solicitud de patente internacional con número PCT/US94/05468.

20 El inmunoensayo puede ser formulado con un cóctel de anticuerpos para unirse a todos los complejos de troponina y a la troponina I y T libre. Como alternativa, el inmunoensayo puede ser formulado con anticuerpos específicos que reconocen epítomos de la troponina I y T en los complejos y también la troponina I y T no unida. Además, el inmunoensayo puede ser formulado con anticuerpos que se unen a epítomos en interfaces de las proteínas componentes en los complejos y anticuerpos que se unen a la troponina I y T no unida.

25 Un inmunoensayo preferente para troponina I o T implica la conjugación de un anticuerpo o un cóctel de anticuerpos a una etiqueta o a un generador de señal para formar un conjugado o conjugados de anticuerpos, que son capaces de unirse a regiones cardíacas específicas de los complejos de troponina de troponina I o T y a troponina I o T no unida. Una persona con conocimientos en la técnica reconocerá que un generador de señal tiene varias formas. Enzimas, partículas metálicas coloidales, partículas de sílice y látex con tinte incorporado, y partículas de tinte son ejemplos de generadores de señal. Los anticuerpos pueden ser conjugados a los generadores de señal en una variedad de maneras usando reactivos heterobifuncionales, tal como se enseña en el Pierce Catalog and Handbook, Pierce Chemical Co., Rockford, IL y en Uniform Latex Particles por Leigh B. Bangs, Seragen Diagnostics Inc., Indianápolis, IN. Otro anticuerpo o cóctel de anticuerpos es inmovilizado en una fase sólida, por ejemplo, una membrana tal como se enseña en BioTechniques 4, 272-283 (1986), y la membrana es colocada en un dispositivo, por ejemplo, tal como se describe en las patentes US 4.727.019 y 5.458.852. El anticuerpo inmovilizado es complementario al conjugado de anticuerpos. El anticuerpo inmovilizado y los anticuerpos del conjugado forman complejos de tipo sándwich con los complejos de troponina I o T y forman también complejos de tipo sándwich con troponina I o T, respectivamente. Una muestra de plasma o suero, sospechosa de contener componentes o complejos de troponina del músculo cardíaco dañado, es mezclada con el conjugado de anticuerpos para formar una mezcla de reacción que se deja incubar. A continuación, la mezcla de reacción es aplicada al dispositivo indicado anteriormente. La muestra fluye a través de la membrana y los componentes y los complejos de troponina, unidos a los conjugados de anticuerpos, se unen a los anticuerpos inmovilizados, y el exceso de conjugados de anticuerpos no unidos es retirado con un tampón de lavado. La señal es desarrollada y leída, bien visualmente o bien instrumentalmente.

45 Un inmunoensayo particularmente preferente para troponina I implica la conjugación de al menos dos anticuerpos a una etiqueta o un generador de señal para formar un conjugado de anticuerpos. Uno de los anticuerpos del conjugado es capaz de unirse al componente de troponina T de los complejos ternarios de troponina y el otro anticuerpo es capaz de unirse a las moléculas libres y binarias de troponina I. Otro anticuerpo o cóctel de anticuerpos es inmovilizado en una fase sólida, por ejemplo, una membrana, y la membrana es colocada en un dispositivo, tal como se ha descrito anteriormente. El anticuerpo inmovilizado es complementario con los anticuerpos del conjugado de anticuerpos para formar complejos de tipo sándwich bien con troponina I unida a complejos de troponina o bien con la troponina I no complejada. Una muestra de suero o plasma, sospechosa de contener componentes o complejos de troponina del músculo cardíaco dañado, es mezclada con el conjugado de anticuerpos para formar una mezcla de reacción que se deja incubar. A continuación, la mezcla de reacción es aplicada al dispositivo indicado anteriormente. La muestra fluye a través de la membrana y los componentes y los complejos de troponina, unidos a los conjugados de anticuerpos, se unen a los anticuerpos inmovilizados y el exceso de conjugados de anticuerpos no unidos es retirado con un tampón de lavado. La señal es desarrollada y leída, bien visualmente o bien instrumentalmente. En este procedimiento de ensayo, el conjugado de anticuerpos se une a la troponina I en complejos ternarios a través del anticuerpo específico de troponina T y todas las moléculas terciarias y libres de troponina I a través del anticuerpo específico de troponina I. El anticuerpo o los anticuerpos de captura en la fase sólida se unen a conjugados de anticuerpos que están unidos a la troponina I libre y a los complejos ternarios de troponina que contienen troponina I.

65 Un inmunoensayo particularmente preferente para troponina I (oxidada y reducida) implica la conjugación de al menos dos anticuerpos a una etiqueta o a un generador de señal para formar un conjugado de anticuerpos. Uno de los anticuerpos del conjugado es capaz de unirse a la troponina I oxidada y el otro anticuerpo es capaz de unirse a las moléculas de troponina I reducida. Otro anticuerpo o cóctel de anticuerpos es inmovilizado en una fase sólida en hasta 2 zonas discretas, por ejemplo, una membrana, y la membrana es colocada en un dispositivo, tal como se ha

descrito anteriormente. El anticuerpo inmovilizado es complementario a los anticuerpos del conjugado de anticuerpos para formar complejos de tipo sándwich o bien con troponina I oxidada o bien con troponina I reducida. Una muestra de plasma o suero, sospechosa de contener componentes de troponina de un músculo cardíaco dañado, es mezclada con el conjugado de anticuerpos para formar una mezcla de reacción que se deja incubar. A continuación, la mezcla de reacción es aplicada al dispositivo indicado anteriormente. La muestra fluye a través de la membrana y la troponina I oxidada y reducida, unida a los conjugados de anticuerpos, se une a los anticuerpos inmovilizados y el exceso de conjugados de anticuerpos no unidos es retirado con un tampón de lavado. La señal es desarrollada y leída, bien visualmente o bien instrumentalmente. En este procedimiento de ensayo, los conjugados de anticuerpos se unen a la troponina I oxidada a través del anticuerpo específico de troponina I oxidada y la troponina I reducida a través del anticuerpo específico de troponina I reducida. El anticuerpo o los anticuerpos de captura en la fase sólida sólo se unen a conjugados de anticuerpos que están unidos a troponina I oxidada y reducida. Este inmunoensayo puede tener aplicación en la estimación del tiempo transcurrido desde un infarto.

Otro inmunoensayo particularmente preferente para troponina I implica la conjugación de un anticuerpo o un cóctel de anticuerpos a una etiqueta o a un generador de señal para formar un conjugado de anticuerpos. El conjugado de anticuerpos se une o bien a troponina I unida a complejos de troponina o bien a la troponina I no complejada. Inmovilizados en una fase sólida, por ejemplo, una membrana, en 3 zonas discretas, hay anticuerpos o cócteles de anticuerpos que se unen al complejo ternario, los complejos binarios de troponina I y la troponina I libre, y la membrana es colocada en un dispositivo, tal como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo de troponina T que se une a la troponina T del complejo ternario es inmovilizada en una zona discreta, un anticuerpo de troponina I que se une a los complejos binarios de troponina I (troponina I/C e I/T) es inmovilizado en otra zona discreta y un anticuerpo de troponina I que se une a solo la troponina I no complejada es inmovilizada en todavía otra zona discreta. Los anticuerpos inmovilizados son complementarios con los anticuerpos del conjugado de anticuerpos para formar complejos de tipo sándwich con troponina I complejada y no complejada, tal como se define mediante cada zona discreta. Como alternativa, inmovilizados en una fase sólida, por ejemplo, una membrana, en 2 zonas discretas, hay anticuerpos o cócteles de anticuerpos que se unen a los complejos (binarios y ternario) de troponina I y a la troponina I libre. Por ejemplo, un anticuerpo de troponina T que se une a la troponina T del complejo ternario y un anticuerpo de troponina I que se une solo a la troponina I de los complejos binarios son inmovilizados en una zona discreta y un anticuerpo de troponina I que se une solo a la troponina I no complejada es inmovilizado en la segunda zona discreta. Los anticuerpos inmovilizados son complementarios con los anticuerpos del conjugado de anticuerpos para formar complejos de tipo sándwich con la troponina I complejada o no complejada, tal como se define por cada zona discreta. Una realización adicional de esta invención utiliza anticuerpos en la fase sólida para la detección de complejos de troponina I que se unen a los interfaces de los dominios de unión de la troponina I/T e I/C. Una muestra de plasma o suero, sospechosa de contener componentes o complejos de troponina de un músculo cardíaco dañado, es mezclada con el conjugado de anticuerpos para formar una mezcla de reacción que se deja incubar. A continuación, la mezcla de reacción es aplicada al dispositivo indicado anteriormente. La muestra fluye a través de la membrana y los componentes y complejos de troponina, unidos al conjugado o a los conjugados de anticuerpos, se unen a los anticuerpos inmovilizados respectivos en las zonas discretas y el exceso de conjugados de anticuerpos no unidos es retirado con un tampón de lavado. La señal es desarrollada y leída, bien visualmente o bien instrumentalmente. En este procedimiento de ensayo, el conjugado de anticuerpos se une a la troponina I y a los complejos binarios y ternario de troponina I a través de un anticuerpo o anticuerpos específicos de troponina I. El anticuerpo o los anticuerpos de captura en las zonas discretas en la fase sólida se unen a los conjugados de anticuerpos que están unidos a la troponina I no complejada o a complejos de troponina que contienen troponina I, tal como se define mediante cada zona discreta. Este inmunoensayo permite la cuantificación de las fracciones de troponina I, concretamente, las fracciones no complejadas y las que forman complejos. Las enseñanzas de la invención descritas en la presente memoria, muestran que la troponina no complejada y complejada existe en las muestras de plasma y suero de pacientes con infarto de miocardio confirmado. La determinación de las fracciones de troponina I complejada o no complejada puede proporcionar datos clínicos importantes en relación al tipo y a la extensión del daño muscular, por ejemplo, de angina inestable o infarto de miocardio o al éxito de una terapia trombolítica.

Otro inmunoensayo particularmente preferente mide el complejo ternario de troponina cardíaca, los complejos binarios de troponina cardíaca (troponina I/T, T/C e I/C) y la troponina I y T cardíaca libre. Este procedimiento implica la conjugación de anticuerpos o cócteles de anticuerpos a una etiqueta o a un generador de señal para formar un conjugado de anticuerpos. Los conjugados de anticuerpos se unen o bien a troponina T e I unida a complejos de troponina o bien a la troponina T e I no complejada. Inmovilizados en una fase sólida, por ejemplo, una membrana, en 1 zona discreta, hay anticuerpos o cócteles de anticuerpos que se unen al complejo ternario, los complejos binarios de troponina I y T y a la troponina I y T libre, y la membrana es colocada en un dispositivo, tal como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo de troponina I que se une a la troponina I del complejo ternario, hasta 3 anticuerpos diferentes, reconociendo cada uno los interfaces de los dominios de unión de troponina I/T, T/C e I/C, un anticuerpo de troponina I que se une a la troponina I libre y un anticuerpo de troponina T que se une a la troponina T libre, son inmovilizados en una zona discreta. Los anticuerpos inmovilizados son complementarios con los anticuerpos del conjugado de anticuerpos para formar complejos de tipo sándwich con troponina I y T complejada y no complejada. Una muestra de plasma o suero, sospechosa de contener componentes o complejos de troponina de un músculo cardíaco dañado, es mezclada con el conjugado de anticuerpos para formar una mezcla de reacción y se deja incubar. A continuación, la mezcla de reacción es aplicada al dispositivo indicado anteriormente. La muestra fluye a través de la membrana y los componentes y complejos de troponina, unidos al conjugado o a los conjugados de anticuerpos, se unen a los anticuerpos inmovilizados respectivos en la zona discreta y el exceso de conjugados de anticuerpos no unidos es retirado con un tampón de lavado. La señal es desarrollada y leída, bien visualmente o

bien instrumentalmente. En este procedimiento de ensayo, los conjugados de anticuerpos se unen a la troponina I y T libre, a la troponina I y T de los complejos binarios y a la troponina I o T del complejo ternario. Los anticuerpos de captura en la zona discreta de la fase sólida se unen a los conjugados de anticuerpos que son específicos para la troponina I y T libre y para los complejos de troponina. Este inmunoensayo permite la cuantificación del complejo ternario de troponina, la troponina T/C, I/T, I/C y la troponina I y T libre. Una persona con conocimientos en la técnica reconocerá que los anticuerpos específicos a las diversas formas de troponina pueden ser conjugados a uno o más generadores de señal para formar conjugados de anticuerpos y los anticuerpos descritos anteriormente para los conjugados pueden ser fijados a la fase sólida en una zona discreta. La determinación de la concentración de troponina total puede proporcionar un inmunoensayo más sensible para un daño al músculo cardíaco que, a su vez, permitirá una diagnosis más rápida de angina inestable o infarto de miocardio y, por lo tanto, una administración más rápida de una terapia trombolítica.

Un inmunoensayo particularmente preferente para troponina T implica la conjugación de al menos dos anticuerpos a una etiqueta o a un generador de señal para formar un conjugado de anticuerpos. Uno de los anticuerpos del conjugado es capaz de unirse al componente de troponina I de los complejos de troponina y el otro anticuerpo es capaz de unirse a las moléculas de troponina T binarias y libres. Otro anticuerpo o cóctel de anticuerpos es inmovilizado en una fase sólida, por ejemplo, una membrana, y la membrana es colocada en un dispositivo, tal como se ha descrito anteriormente. El anticuerpo inmovilizado es complementario con los anticuerpos del conjugado de anticuerpos para formar complejos de tipo sándwich con troponina T unida a complejos de troponina o a la troponina T no complejada. Una muestra de plasma o suero, sospechosa de contener componentes o complejos de troponina de un músculo cardíaco dañado, es mezclada con el conjugado de anticuerpos para formar una mezcla de reacción y se deja incubar. A continuación, la mezcla de reacción es aplicada al dispositivo indicado anteriormente. La muestra fluye a través de la membrana y los componentes y los complejos de troponina, unidos a los conjugados de anticuerpos, se unen a los anticuerpos inmovilizados y el exceso de conjugados de anticuerpos no unidos es retirado con un tampón de lavado. La señal es desarrollada y leída, bien visualmente o bien instrumentalmente. En este procedimiento de ensayo, el conjugado de anticuerpos se une a los complejos de troponina a través del anticuerpo específico de troponina I y todas las moléculas de troponina T binarias y libres a través del anticuerpo específico de troponina T. El anticuerpo o los anticuerpos de captura en la fase sólida se unen a los conjugados de anticuerpos que están unidos a la troponina T libre, y a los complejos de troponina que contienen troponina T.

Otro inmunoensayo particularmente preferente para troponina T implica la conjugación de un anticuerpo o cóctel de anticuerpos a una etiqueta o a un generador de señal para formar un conjugado de anticuerpos. El conjugado de anticuerpos se une o bien a troponina T unida a complejos de troponina o bien a la troponina T no complejada. Inmovilizados en una fase sólida, por ejemplo, una membrana, en 3 zonas discretas, hay anticuerpos o cócteles de anticuerpos que se unen al complejo ternario, a los complejos binarios de troponina T y a la troponina T libre, y la membrana es colocada en un dispositivo, tal como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo de troponina I que se une a la troponina I del complejo ternario es inmovilizado en una zona discreta, un anticuerpo de troponina T que se une a los complejos binarios (troponina I/T y C/T) de troponina T es inmovilizado en otra zona discreta y un anticuerpo de troponina T que se une solo a la troponina T no complejada es inmovilizado en todavía otra zona discreta. Los anticuerpos inmovilizados son complementarios con los anticuerpos del conjugado de anticuerpos para formar complejos de tipo sándwich con troponina T complejada o no complejada, tal como se define mediante cada zona discreta. Como alternativa, inmovilizados en una fase sólida, por ejemplo, una membrana, en 2 zonas discretas, hay anticuerpos o cócteles de anticuerpos que se unen a los complejos (binarios y ternario) de troponina T y a la troponina T libre. Por ejemplo, un anticuerpo de troponina I que se une a la troponina I del complejo ternario y un anticuerpo de troponina T que se une a la troponina T de los complejos binarios son inmovilizados en una zona discreta y un anticuerpo de troponina T que se une solo a la troponina T no complejada es inmovilizado en la segunda zona discreta. Los anticuerpos inmovilizados son complementarios con los anticuerpos del conjugado de anticuerpos para formar complejos de tipo sándwich con troponina T complejada o no complejada, tal como se define mediante cada zona discreta. Una realización adicional de esta invención utiliza anticuerpos en la fase sólida para la detección de complejos de troponina T que se unen a los interfaces de los dominios de unión de troponina C/T e I/T. Una muestra de plasma o suero, sospechosa de contener componentes o complejos de troponina de un músculo cardíaco dañado, es mezclada con el conjugado de anticuerpos para formar una mezcla de reacción que se deja incubar. A continuación, la mezcla de reacción es aplicada al dispositivo indicado anteriormente. La muestra fluye a través de la membrana y los componentes y complejos de troponina, unidos al conjugado o conjugados de anticuerpos, se unen a los anticuerpos inmovilizados respectivos, en las zonas discretas, y el exceso de conjugados de anticuerpos no unidos es retirado con un tampón de lavado. La señal es desarrollada y leída, bien visualmente o bien instrumentalmente. En este procedimiento de ensayo, el conjugado de anticuerpos se une a la troponina T y a los complejos binarios y ternario de troponina T a través del anticuerpo o anticuerpos específicos de troponina T. El anticuerpo o anticuerpos de captura en zonas discretas en la fase sólida se unen a los conjugados de anticuerpos que están unidos a la troponina T no complejada o a complejos de troponina que contienen troponina T, tal como se define mediante cada zona discreta. Este inmunoensayo permite la cuantificación de las fracciones de troponina T, concretamente, las fracciones complejadas y no complejadas. Las enseñanzas de la invención descritas en la presente memoria muestran que la troponina no complejada y complejada existe en las muestras de plasma y suero de pacientes con infarto de miocardio confirmado. La determinación de las fracciones de troponina T complejada y no complejada puede proporcionar importantes datos clínicos en relación al tipo y a la extensión de un daño muscular, por ejemplo, de angina inestable o infarto de miocardio o al éxito de una terapia trombolítica.

Otro inmunoensayo particularmente preferente mide independientemente el complejo ternario de troponina cardíaca, los complejos binarios de troponina cardíaca (troponina I/T, T/C e I/C) y la troponina I y T cardíaca libre. Este procedimiento implica la conjugación de anticuerpos o un cóctel de anticuerpos a una etiqueta o a un generador de señal para formar un conjugado de anticuerpos. Los conjugados de anticuerpos se unen o bien a troponina T e I unida a complejos de troponina o bien a la troponina T e I no complejada. Inmovilizados en una fase sólida, por ejemplo, una membrana en 6 zonas discretas, hay anticuerpos o cócteles de anticuerpos, que se unen al complejo ternario, los complejos binarios de troponina I y T y la troponina I y T libre, y la membrana es colocada en un dispositivo, tal como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo de troponina I que se une a la troponina I del complejo ternario es inmovilizado en una zona discreta, 3 anticuerpos diferentes, reconociendo cada uno los interfaces de los dominios de unión de troponina I/T, T/C e I/C, son inmovilizados en 3 zonas discretas, un anticuerpo de troponina I que se une a la troponina I libre es inmovilizado en otra zona y un anticuerpo de troponina T que se une a la troponina T libre es inmovilizado en otra zona. Los anticuerpos inmovilizados son complementarios con los anticuerpos del conjugado de anticuerpos para formar complejos de tipo sándwich con troponina T e I complejada y no complejada, tal como se define mediante cada zona discreta. Una muestra de plasma o suero, sospechosa de contener componentes o complejos de troponina de un músculo cardíaco dañado, es mezclada con el conjugado de anticuerpos para formar una mezcla de reacción y se deja incubar. A continuación, la mezcla de reacción es aplicada al dispositivo indicado anteriormente. La muestra fluye a través de la membrana y los componentes y los complejos de troponina, unidos al conjugado o a los conjugados de anticuerpos, se unen a los anticuerpos respectivos inmovilizados en las zonas discretas y el exceso de conjugados de anticuerpos no unidos es retirado con un tampón de lavado. La señal es desarrollada y leída, bien visualmente o bien instrumentalmente. En este procedimiento de ensayo, los conjugados de anticuerpos se unen a la troponina I y T libre, a la troponina I y T de los complejos binarios y a la troponina I o T del complejo ternario. Los anticuerpos de captura en las zonas discretas en la fase sólida se unen a los conjugados de anticuerpos que son específicos a la troponina I y T libre y a los complejos de troponina. Este inmunoensayo permite la cuantificación del complejo ternario de troponina, la troponina T/C, I/T, I/C y la troponina I y T libre. Las enseñanzas de la invención descritas en la presente memoria muestran que la troponina no complejada y complejada existe en las muestras de plasma y suero de pacientes con infarto de miocardio confirmado. Las determinaciones del complejo ternario de troponina, los complejos binarios de troponina I y T y las fracciones de troponina I y T no complejada, individuales, pueden proporcionar importantes datos clínicos en relación al tipo y a la extensión de un daño muscular, por ejemplo, de una angina inestable o un infarto de miocardio o al éxito de una terapia trombolítica.

Otro inmunoensayo particularmente preferente mide independientemente el complejo ternario de troponina cardíaca, los complejos binarios de troponina cardíaca (troponina I/T, T/C, I/T oxidada e I/C oxidada) y la troponina I (oxidada y reducida) y T cardíaca libre. Este procedimiento implica la conjugación de anticuerpos o de cócteles de anticuerpos a una etiqueta o a un generador de señal para formar un conjugado de anticuerpos. Los conjugados de anticuerpos se unen o bien a troponina T e I unida a complejos de troponina o bien a la troponina T e I no complejada. Inmovilizados en una fase sólida, por ejemplo, una membrana, en hasta 9 zonas discretas, hay anticuerpos o cócteles de anticuerpos que se unen al complejo ternario, los complejos binarios de troponina I y T y la troponina I y T libre, y la membrana es colocada en un dispositivo, tal como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo de troponina I que se une a la troponina I del complejo ternario es inmovilizada en una zona discreta, 5 anticuerpos diferentes, reconociendo cada uno los interfaces de los dominios de unión de troponina I/T, T/C, I/C, I/T oxidada e I/C oxidada son inmovilizados en hasta 5 zonas discretas, un anticuerpo de troponina I que se une a la troponina I libre (oxidada y reducida) es inmovilizado en hasta 2 zonas discretas y un anticuerpo de troponina T que se une a la troponina T libre es inmovilizado en otra zona. Los anticuerpos inmovilizados son complementarios con los anticuerpos del conjugado de anticuerpos para formar complejos de tipo sándwich con troponina T e I complejada y no complejada, tal como se define por medio de cada zona discreta. Una muestra de plasma o suero, sospechosa de contener componentes o complejos de troponina de un músculo cardíaco dañado, es mezclada con el conjugado de anticuerpos para formar una mezcla de reacción y se deja incubar. A continuación, la mezcla de reacción es aplicada al dispositivo indicado anteriormente. La muestra fluye a través de la membrana y los componentes y los complejos de troponina, unidos al conjugado o a los conjugados de troponina, se unen a los anticuerpos respectivos inmovilizados en las zonas discretas y el exceso de conjugados de anticuerpos no unidos es retirado con un tampón de lavado. La señal es desarrollada y leída, bien visualmente o bien instrumentalmente. En este procedimiento de ensayo, los conjugados de anticuerpos se unen a la troponina I y T, a la troponina I y T de los complejos binarios y a la troponina I o T del complejo ternario. Los anticuerpos de captura en las zonas discretas en la fase sólida se unen a los conjugados que son específicos a la troponina I y T libre y a los complejos de troponina. Este inmunoensayo permite la cuantificación del complejo ternario de troponina, la troponina T/C, I/T, I/C, I/T oxidada e I/C oxidada y a la troponina I (oxidada y reducida) y T libre. La troponina no complejada y complejada existe en las muestras de plasma y suero de pacientes con infarto de miocardio confirmado. Las determinaciones del complejo ternario de troponina, los complejos binarios de troponina I y T y las fracciones de troponina I y T no complejada, individuales, puede proporcionar datos clínicos importantes en relación al tipo y a la extensión del daño muscular, por ejemplo, de una angina inestable o un infarto de miocardio o al éxito de una terapia trombolítica.

Un inmunoensayo particularmente preferente para troponina mide la concentración de dos o más formas de troponina, por ejemplo de troponina I y/o T libre y complejada, utilizando anticuerpos que tienen grados variables de reconocimiento para las diferentes formas de troponina. Un anticuerpo o un cóctel de anticuerpos son conjugados a una etiqueta o a un generador de señal para formar un conjugado de anticuerpos. El conjugado de anticuerpos tiene la capacidad de unirse a cada forma de troponina que debe cuantificarse. Un anticuerpo preferente para el conjugado sería un anticuerpo "insensible", tal como se ha definido anteriormente. Inmovilizados en una fase sólida, por ejemplo, una membrana en un dispositivo, en zonas discretas, hay anticuerpos o cócteles de anticuerpos que son complemen-

ES 2 339 561 T3

tarios al anticuerpo o a los anticuerpos del conjugado de anticuerpos. Las características esenciales de los anticuerpos inmovilizados se definen en términos de sus respuestas en el ensayo, y, por lo tanto, se discuten más adelante después de la descripción del ensayo. Pueden discutirse las características esenciales del ensayo para el caso en el que deben cuantificarse dos formas de troponina. En el caso en el que deben cuantificarse dos formas, forma 1 y 2, de troponina, se utilizan dos zonas discretas. El sistema se calibra usando dos conjuntos de calibradores en una matriz adecuada, tal como sangre, plasma o suero. Preferentemente, un conjunto de calibradores contiene la forma 1 de troponina en varias concentraciones y la otra contiene la forma 2 de troponina. Independientemente, cada uno de los calibradores es mezclado con el conjugado de anticuerpos para formar una mezcla de reacción que se deja incubar. A continuación, la mezcla de reacción es aplicada al dispositivo indicado anteriormente. La muestra fluye a través de la membrana y la troponina, unida al conjugado o a los conjugados de anticuerpos, se une a los anticuerpos inmovilizados en las zonas discretas y el exceso de conjugados de anticuerpos no unidos es retirado con un tampón de lavado. La señal en ambas zonas 1 y 2 es desarrollada y medida para cada calibrador. El sistema más sencillo y preferente sería uno en el que la señal del ensayo fuese lineal, o pudiese aproximarse para ser lineal, con respecto a la concentración de troponina. En este caso, el procedimiento de calibración proporcionaría cuatro pendientes de ensayo independientes definidas tal como se indica a continuación:

m_{11} = pendiente de ensayo determinada en la zona 1 usando la forma 1 de troponina como calibrador (Ec. 1a)

m_{12} = pendiente de ensayo determinada en la zona 1 usando la forma 2 de troponina como calibrador (Ec. 1b)

m_{21} = pendiente de ensayo determinada en la zona 2 usando la forma 1 de troponina como calibrador (Ec. 1c)

m_{22} = pendiente de ensayo determinada en la zona 2 usando la forma 2 de troponina como calibrador (Ec. 1d)

y dos constantes de ensayo independientes, definidas tal como se indica a continuación:

c_1 = señal de ensayo en la zona 1 correspondiente a la concentración cero de troponina. (Ec. 2a)

c_2 = señal de ensayo en la zona 2 correspondiente a la concentración cero de troponina (Ec. 2b)

Una persona con conocimientos en la técnica reconocerá que las pendientes y las constantes mostradas en las Ecs. 1 y 2 podrían determinarse también en una calibración en la que las soluciones del calibrador comprenden ambas formas de troponina en varias relaciones de concentraciones diferentes. Una muestra de sangre, plasma o suero, sospechosa de contener formas 1 y 2 de troponina es ensayada, a continuación, tal como se ha descrito anteriormente para los calibradores. El ensayo proporciona dos valores de señal: S_1 es la señal medida en la zona 1 y S_2 es la señal medida en la zona 2. Las dos señales se describen mediante dos ecuaciones lineales independientes:

$S_1 = m_{11}[\text{forma 1}] + m_{12}[\text{forma 2}] + c_1$ (Ec. 3a)

$S_2 = m_{21}[\text{forma 1}] + m_{22}[\text{forma 2}] + c_2$ (Ec. 3b)

donde [forma 1] y [forma 2] son las concentraciones de la forma 1 y 2 de troponina, respectivamente, en la muestra. Las ecuaciones 3 pueden ser resueltas usando técnicas estándar de álgebra lineal para determinar los valores para [forma 1] y [forma 2] en la muestra si:

$$m_{11}m_{22} - m_{12}m_{21} \neq 0 \quad (\text{Ec. 4})$$

(véase, por ejemplo, *Mathematical Methods for Physicists*, Acad. Press, NY, NY). Las ecuaciones 1 y 4 definen, por lo tanto, las respuestas de ensayo que se requieren para los anticuerpos en la zona 1 y en la zona 2 para determinar las concentraciones de la forma 1 y la forma 2 de troponina, a partir de las señales S_1 y S_2 medidas. En general, la exactitud de la determinación de las concentraciones de la forma 1 y la forma 2 incrementará con un incremento en la diferencia mostrada en la Ec. 4. El valor de la diferencia requerida para obtener un resultado satisfactorio dependerá de la precisión de la calibración y del ensayo, y de la exactitud requerida para la concentración de troponina. Para la mayoría de sistemas de ensayo, un ensayo preferente es uno en el que el anticuerpo o cóctel de anticuerpos en al menos

ES 2 339 561 T3

una de las zonas es sensible a si la troponina es de la forma 1 o de la forma 2, donde “sensible” se define como en una sección anterior. Por ejemplo, cualquiera de entre la relación m_{11}/m_{12} y la relación m_{22}/m_{21} o ambas debería ser mayor que aproximadamente 2. Este procedimiento para determinar las concentraciones de dos formas de troponina puede extenderse a más de dos formas. Si deben medirse N formas, deben usarse N zonas discretas. Debe realizarse una calibración utilizando un mínimo de N+1 soluciones de calibrador compuestas de N formas de troponina. Se ensaya una muestra sospechosa de contener las N formas de troponina. Se mide la señal de ensayo de cada una de las N zonas; la señal S_i de la zona i puede expresarse como se indica a continuación:

$$S_i = \sum_{j=1}^{j=N} m_{ij} (\text{forma } j) + c_i \quad \text{Ec. 5}$$

donde m_{ij} es la pendiente de ensayo determinada para la zona i usando la forma j de la troponina como calibrador y la [forma j] es la concentración de la forma j de la troponina en la muestra. La ec. 5 define un conjunto de N ecuaciones lineales que pueden ser resueltas para determinar las concentraciones de todas las N formas de troponina usando técnicas estándar, si el determinante de la matriz compuesta por los m_{ij} s no es igual a cero. Para la mayoría de los sistemas de ensayo, un ensayo preferente es uno en el que al menos N-1 de las zonas contienen un anticuerpo o un cóctel de anticuerpos que es sensible a en qué forma se encuentra la troponina, es decir, la relación m_{ii}/m_{ij} , donde $i \neq j$, es mayor que aproximadamente 2. Finalmente, estos conceptos pueden extenderse al caso en el que la respuesta del ensayo es no lineal con la concentración de troponina. En este caso, la señal medida en la i-ava zona, de entre las N zonas, vendrá dada por la relación:

$$S_i = \sum_{j=1}^{j=N} F_{ij} \quad (\text{Ec. 6})$$

donde F_{ij} es una función de la [forma j] que describe la respuesta de la dosis (señal como una función de la [forma j]) o la forma j en la zona I y que es determinada en un procedimiento de calibración similar a los descritos anteriormente. La Ecuación 6 describe un sistema de N ecuaciones no lineales que puede ser resuelto para determinar las concentraciones de las N formas de troponina usando, por ejemplo, procedimientos de aproximación (por ordenador) familiares para las personas con conocimientos en la técnica.

Inhibidores, que afectan a las constantes de afinidad de la asociación de los complejos de troponina I o de los complejos de troponina T, pueden añadirse a la muestra previamente a o durante la formación de la mezcla de reacción, de manera que se midan la troponina I o troponina T libre, respectivamente. Los inhibidores de unión pueden alterar los complejos de troponina o pueden abrir o desenredar parcialmente el complejo, de manera que algunas o todas las interacciones entre los componentes de troponina se rompan, de manera que los epítomos puedan ser más fácilmente accesibles a los anticuerpos para la unión. Los inhibidores pueden ser seleccionados de entre el grupo de compuestos que comprenden, pero no se limitan a, agentes quelantes metálicos y péptidos que compiten con la troponina I o la troponina T para unirse a proteínas del aparato contráctil. Los agentes quelantes metálicos, particularmente los que se unen a calcio y a magnesio, reducen la constante de afinidad, por ejemplo, de la unión de la troponina I y la troponina C en aproximadamente un factor de 10, en comparación con la afinidad en presencia de calcio (Biochemistry 33, 12729-12734 (1994)). Los péptidos que afectan a la unión de la troponina I y la troponina T a proteínas del aparato contráctil incluyen mastoparan, melitina y secuencias peptídicas que imitan las secuencias de troponina I y troponina T en sus dominios de unión con las proteínas del aparato contráctil ((Biochemistry 31, 11326-11334 (1992), J. Biol. Chem. 267, 15715-15723 (1992), Biochemistry 33, 8233-8239 (1994)). Otros péptidos que son útiles como inhibidores son los que imitan los dominios de unión de los componentes de troponina. Los dominios de unión se describen, por ejemplo, en Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 16, 535-559 (1987), y con la información sobre el dominio de unión, una persona con conocimientos en la técnica sintetiza el péptido que imita al péptido de la proteína en el dominio de unión.

La troponina C puede ser añadida a la muestra previamente a o durante la formación de la mezcla de reacción del inmunoensayo, de manera que toda o prácticamente toda la troponina I o T en la muestra se unirá a la troponina C durante el transcurso del ensayo. La concentración de troponina C en la muestra debería ser de aproximadamente 0,5 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$ y preferentemente aproximadamente de 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$.

La troponina C y T puede ser añadida también a las muestras previamente a o durante la formación de la mezcla de reacción de los inmunoensayos para la troponina I, con el fin de unir toda o prácticamente toda la troponina I en la forma del complejo ternario de troponina. Las concentraciones de troponina C y T en la muestra deberían ser aproximadamente de 0,5 a 100 $\mu\text{g/ml}$ y preferentemente aproximadamente de 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$.

La troponina C e I puede ser añadida también a las muestras previamente a o durante la formación de la mezcla de reacción de los inmunoensayos para la troponina T, con el fin de unir toda o prácticamente toda la troponina T en la forma del complejo ternario de troponina. Las concentraciones de troponina C y T en la muestra deberían ser aproximadamente de 0,5 a 100 $\mu\text{g/ml}$ y preferentemente aproximadamente de 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$.

ES 2 339 561 T3

Estas realizaciones, en las que los componentes de troponina son añadidos a la muestra previamente a o durante la formación de la mezcla de reacción, tienen varias ventajas.

Primero, la troponina I se absorbe tenazmente en las superficies de vidrio y varias membranas, lo cual puede resultar en una menor concentración de troponina I medida. La troponina I también se absorbe en las superficies. Sin embargo, cuando está unida a la troponina C o en el complejo ternario, las características de absorción de la troponina I y C pueden ser reducidas drásticamente. De esta manera, la recuperación del complejo de troponina I/C o T/C o del complejo ternario puede ser mejor que la troponina I o T. En esta realización, anticuerpos que reconocen los complejos de troponina I o T son usados en los inmunoensayos.

Segundo, si se requieren anticuerpos que se unen solo a la troponina I o T complejada, entonces el procedimiento de selección de anticuerpos es menos restrictivo ya que no se requiere que los anticuerpos tengan una afinidad similar a la troponina I o T libre.

Una persona con conocimientos en la técnica apreciará las enseñanzas de la invención descritas en la presente memoria y reconocerá, con estas enseñanzas, que la adición de reactivos a un dispositivo o unos a los otros, tal como se ha descrito en las realizaciones, tiene muchas formas, y que estas formas están dentro del alcance de esta invención.

Estabilización de la troponina I o T para los reactivos del calibrador

Se sabe que la troponina I y T es inestable en formulaciones acuosas, así como en muestras de pacientes. Las inestabilidades (aparentes) de las proteínas están relacionadas con el estado de oxidación de la proteína I, la propensión de la troponina I y T para formar complejos con otras proteínas de troponina y las características de absorción de la troponina I y T en superficies.

La estabilización de la troponina I es realizada mediante la oxidación intramolecular de las cisteínas y la proteína es almacenada sin agentes reductores tiol, tales como mercaptoetanol, ditiotreitól y similares.

El almacenamiento de troponina I en soluciones que contienen altas concentraciones de reductores tiol mantendrá las cisteínas, en general, en la forma reducida. Sin embargo, la reducción y la oxidación intramolecular de una proteína es un proceso dinámico, mediante el cual la proteína existirá durante algún tiempo en la forma oxidada incluso en presencia de los reductores. En el caso de los reductores, tales como mercaptoetanol o N-acetilcisteína, es decir, moléculas reductoras con solo un único grupo tiol, se formarán disulfuros mixtos del reductor y la tiol proteína. La semivida de este disulfuro mixto será una función de la concentración de reductor y la tasa de oxidación intramolecular; es decir, el disulfuro mixto puede ser reducido por ambos el reactivo reductor tiol y la otra cisteína de proteína, suponiendo que ambas cisteínas no están en la forma disulfuro mixto. En el caso de la reducción de la troponina I oxidada intramolecularmente, el reductor con un único grupo tiol reducirá la cisteína intramolecular para proporcionar una cisteína y un disulfuro mixto de la proteína. El disulfuro mixto de la proteína será reducido o bien por la cisteína de la proteína o bien por el reductor tiol. Este proceso continúa y eventualmente la concentración del reductor se agota hasta un nivel en el que ya no puede mantener la proteína en el estado reducido. Conforme la concentración de reductor se aproxima a la concentración de tiol en la troponina I, la cisteína de proteína y el reactivo reductor tiol pueden formar disulfuros mixtos, que serán reducidos ahora por el reductor tiol. Como alternativa, la proteína se oxidará, intramolecularmente, y el reductor tiol no está presente en una concentración suficiente para reducir la cisteína. El resultado final, tras el agotamiento del reductor tiol, será una mezcla de troponina I que está en la forma oxidada intramolecularmente y proteína que está en la forma disulfuro mixto. Cada una de estas formas de troponina I tiene una conformación diferente.

En el caso de utilizar reactivos reductores tiol que poseen dos grupos tiol, por ejemplo, ditiotreitól o ditioeritritól, el resultado final, tras el agotamiento del reductor tiol, será solo la forma oxidada de la troponina I.

Por lo tanto, los anticuerpos que son sensibles al estado de oxidación de la troponina I reconocerán diferencialmente las diversas formas de la troponina I en el inmunoensayo. Entonces, el inmunoensayo medirá una concentración inexacta de troponina I.

Una composición preferente de troponina I estabilizada comprende una solución acuosa de la troponina I oxidada intramolecularmente.

Una composición particularmente preferente de troponina I y T estabilizada comprende una solución tamponada del complejo ternario de troponina I, T y C en presencia o en ausencia de sales de calcio y magnesio. Un intervalo preferente de pH de la solución es entre 6 y 9 y un intervalo de concentraciones de sales de calcio y magnesio, por ejemplo cloruro de calcio y magnesio, de entre 0,01 mM y 10 mM. Una solución tamponada particularmente preferente consiste en hasta aproximadamente el 100% de plasma o suero humano. El complejo ternario puede ser formado a partir de la troponina I, T y C componente, o como alternativa, puede ser aislado y purificado a partir de músculo esquelético o cardíaco (Methods Enzymol. 85, 241-263 (1982)).

ES 2 339 561 T3

Procedimientos para mejorar la recuperación de troponina I en membranas

Se sabe que la absorción de troponina I y T en superficies y en varias proteínas ocurre y este fenómeno puede reducir la concentración de troponina medida. En particular, cuando se realizan inmunoensayos en dispositivos o en instrumentos que tiene un gran área superficial, por ejemplo, cuando se incorporan membranas o partículas de látex en el procedimiento de ensayo, el área superficial que es expuesta a la muestra puede reducir la recuperación de troponina. Las membranas realizadas en nailon o las composiciones de fibras de vidrio que tienen tamaños de entre 2 mm x 2 mm x 1 mm y 40 mm x 40 mm x 5 mm pueden influenciar la recuperación de troponina I y T cuando se acoplan al procedimiento de ensayo. Las moléculas de troponina I y T tienen un alto grado de aminoácidos básicos. Al pH fisiológico, los aminoácidos básicos están muy positivamente cargados y estos grupos cargados contribuyen al comportamiento absorbente de las proteínas.

En un aspecto de la solicitud, se añaden varios componentes a las membranas o a las partículas de látex para mejorar la recuperación de troponina I y T en el procedimiento de inmunoensayo. Específicamente, péptidos o proteínas que son también fuertemente básicos, son añadidos a las membranas o a las partículas de látex o a las superficies de los dispositivos implicados en el procedimiento de ensayo, previamente a o durante la adición de la muestra o la mezcla de reacción. Los compuestos preferentes para este uso incluyen péptidos, proteínas y polímeros con valores de pH superiores a aproximadamente 8. Incluidos en este grupo están salmina, lisozima, citocromos, protamina, polilisina, polivinil amina, melitina y mastoparan. Las concentraciones de reactivos bloqueadores que son añadidas a las superficies o a las membranas están en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg/ml a 100 mg/ml y típicamente de aproximadamente 0,1 mg/ml a 10 mg/ml.

Sección experimental

Ejemplo 1

Recuperación de troponina I y T de las superficies tras el uso de troponina C

En una realización preferente de esta invención, la recuperación de troponina I y T de una variedad de superficies, incluyendo, pero sin limitarse a, membranas, vidrio y filtros de poliéster, dispositivos y recipientes de plástico y vidrio, partículas de látex, liposomas, varios componentes sanguíneos, incluyendo lipoproteínas de muy baja densidad, lipoproteínas de baja densidad, lipoproteínas de alta densidad, proteínas de la cascada de coagulación, varias proteínas sanguíneas y similares, es mejorada mediante la formación de complejos binarios o ternario de troponina I y/o T.

Para mejorar la recuperación de troponina I, las concentraciones útiles de troponina C y/o troponina T que son aplicadas a diversas superficies son de 1 ng/ml a 1 mg/ml, preferentemente en presencia de 0-1000 equivalentes mol de calcio o magnesio. Las soluciones aplicadas pueden secarse o no, dependiendo de la aplicación de la técnica que utiliza una recuperación mejorada. La masa real de troponina C y/o I necesaria para recuperaciones mejoradas está relacionada con el área superficial del medio que está en contacto con la muestra de troponina I. Los filtros, membranas, materiales absorbentes y partículas de látex, por ejemplo, tienen un área superficial relativamente más grande que la superficie de un recipiente liso, por ejemplo, y una persona con conocimientos en la técnica reconocerá que sería necesaria una mayor masa de troponina C y/o T para recuperaciones máximas.

Para mejorar la recuperación de troponina T, las concentraciones útiles de troponina C y/o troponina I que son aplicadas a diversas superficies son de aproximadamente 1 ng/ml a 1 mg/ml. Las soluciones aplicadas pueden secarse o no, dependiendo de la aplicación de la técnica que utiliza una recuperación mejorada. La masa real de troponina C y/o T necesaria para recuperaciones mejoradas está relacionada con el área superficial del medio que está en contacto con la muestra de troponina T. Los filtros, membranas, materiales absorbentes y partículas de látex, por ejemplo, tienen un área superficial relativamente mayor que la superficie de recipientes lisos, por ejemplo, y una persona con conocimientos en la técnica reconocerá que sería necesaria una masa mayor de troponina C y/o I para recuperaciones máximas.

Ejemplo 2

55

Uso de troponina C para incrementar la recuperación de troponina I

La troponina I cardíaca humana oxidada (Bio-tech International) y el complejo ternario de troponina cardíaca humana (Biotech International) fueron fijadas en sangre o plasma y fueron ensayadas en un dispositivo de inmunoensayo (tal como se describe en la patente US No 5.458.852), en el que las muestras de sangre o plasma se pasaron a través de una membrana de filtro de sangre (tal como se describe, por ejemplo, en la patente US No 6.391.265, presentada el 26 de Agosto, 1996) que contenía diversas cantidades de troponina C.

Los filtros de sangre (Ahlstrom; aproximadamente 1,5 x 1,5 x 0,06 cm) fueron preparados añadiendo 150 μ l de una solución acuosa de troponina C (Bio-Tech International; bien purificada de un corazón humano o de un músculo esquelético de conejo), con o sin cloruro de calcio, secando el filtro durante una hora a 45°C y montándolos en los dispositivos de ensayo. La troponina C (50 μ g/ml, originarias de un corazón humano) fue añadida también directamente a algunas muestras de sangre o plasma que contenían 0-20 ng/ml de troponina I. Las muestras de sangre o plasma

ES 2 339 561 T3

fueron añadidas a la cámara de adición de muestras de los dispositivos que alojaban el filtro de sangre. En el caso de las muestras de sangre, el filtro separó las células rojas sanguíneas del plasma (tal como se describe, por ejemplo, en la patente US No. 6.391.265, presentada el 26 de Agosto 1996). El plasma (de las muestras de sangre o plasma) se pasó desde el filtro de sangre a una cámara de reacción mediante acción capilar. La cámara de reacción contenía reactivos secos que fueron reconstituidos por medio del plasma para formar una mezcla de reacción.

Los reactivos incluían un conjugado que consistía en partículas de látex con transferencia de energía fluorescente (FETL), (por ejemplo, partículas como las divulgadas en la patente US No. 6.251.687, presentada el 23 de Marzo 1995), y los anticuerpos anti-troponina I recombinantes #4 y #57 (véase el Ejemplo 23). El conjugado FETL-anticuerpo fue preparado mediante técnicas de conjugación de proteínas estándar familiares para las personas con conocimientos en la técnica (por ejemplo, haciendo reaccionar SMCC con partículas de látex que contienen aminos y, a continuación, haciendo reaccionar anticuerpo-tiol (preparado mediante una reacción de SPDP y anticuerpo, con partícula de látex-SMCC para formar un conjugado de anticuerpos, tal como se describe en Pierce Chemical Co. 1994, p. T166 y T192, y los procedimientos descritos en Uniform Latex Particles, Seradyn Inc., Indianapolis, IN, p. 31-40; y también los procedimientos descritos en Microparticle Reagent Optimization, Seradyn Inc., p. 91-97). Los reactivos incluían también anticuerpo policlonal específico de péptido 3 de anti-troponina I de cabra biotinilado, que formó pares complementarios con los anticuerpos #4 y #57 del conjugado, que eran insensibles a si la troponina I estaba libre, en un complejo binario I/C, I/T o un complejo ternario I/C/T.

La mezcla de reacción fue mantenida en la cámara de reacción durante 4 minutos para permitir que la troponina I reaccionara con los anticuerpos. Después de 4 minutos de incubación, la mezcla de reacción se dejó fluir hacia abajo (mediante acción capilar) por un línea diagnóstica que tenía avidina-HS inmovilizada en una superficie en una zona de captura. Los conjugados de anticuerpos FETL no unidos fueron retirados de la zona de captura mediante el exceso de plasma del filtro de sangre que fluyó hacia abajo por la línea de diagnóstico después de la mezcla de reacción. La cantidad de conjugados FETL-anticuerpo unidos a la zona de captura incrementó monótonicamente con la concentración de troponina I en la muestra de sangre o plasma y fue cuantificada explorando la línea de diagnóstico con un fluorómetro que consistía en una fuente de excitación de diodo láser (670 nm) y un detector con fotodiodo de silicio que mide la fluorescencia en la máxima longitud de onda de 760 nm con la electrónica y los filtros ópticos apropiados para obtener la señal fluorescente.

Los resultados de ensayo sobre el efecto de la troponina C en el filtro de sangre se muestran en la Tabla 1. La respuesta de ensayo fraccionario fue calculada dividiendo la pendiente del ensayo (señal fluorescente por ng/ml de troponina I) para la muestra por la pendiente de ensayo obtenida en ausencia de troponina C en la muestra y el filtro de sangre. Cada valor de la respuesta de ensayo fraccionario es la media de 8 a 10 medidas.

Los resultados (Tabla 1) muestran que la presencia de troponina C en la sangre o en el plasma o en la membrana de filtro de sangre incrementó la respuesta de ensayo fraccionario, es decir, incrementó la recuperación de troponina I del filtro de sangre.

TABLA 1

MUESTRA	TROPONINA C EN FILTRO DE SANGRE	RESPUESTA DE ENSAYO FRACCIONARIO
Troponina I en plasma	Ninguna	1,0
Complejo de troponina en plasma	Ninguna	1,5
Troponina I en plasma	1 µg/ml TnC humana	1,5
Troponina I en plasma	10 µg/ml TnC humana	1,8
Troponina I en plasma	100 µg/ml TnC humana	1,6
Troponina I en plasma	10 µg/ml TnC de conejo	1,6

ES 2 339 561 T3

5	Troponina I en sangre entera	Ninguna	1,0
	Troponina I y troponina C en sangre entera	Ninguna	3,0
10	Complejo de troponina en sangre entera	Ninguna	2,1
	Troponina I en sangre entera	1 µg/ml de TnC humana	1,6
15	Troponina I en sangre entera	10 µg/ml de TnC humana	1,9
	Troponina I en sangre entera	100 µg/ml de TnC humana	1,6
20	Troponina I en sangre entera	10 µg/ml de TnC de conejo	2,9
25	Troponina I en sangre entera	10 µg/ml TnC de conejo 20 pM CaCl	2,9

30 Debe indicarse que, tal como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, y “el”, “la” incluyen los referentes plurales, a no ser que el contexto indique claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a “una formulación” incluye mezclas de diferentes formulaciones y la referencia a “el procedimiento de tratamiento” incluye la referencia a procedimientos y etapas equivalentes conocidos por las personas con conocimientos en la técnica, etcétera.

35 Si no se definen de otro modo, todos los términos científicos y técnicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que conoce una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier material y procedimiento similar a equivalente a los descritos en la presente memoria pueden ser usados en la práctica o en el ensayo de la invención, los materiales y los procedimientos preferentes se describen ahora.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de inmunoensayo para medir la troponina I y/o T cardíaca, que comprende:

5 un filtro para recibir una muestra de sangre, suero o plasma, en el que dicho filtro comprende troponina C aplicada al mismo;

10 una cámara de reacción que comprende un reactivo conjugado de anticuerpos secado que comprende un anticuerpo que forma un complejo con la troponina I y/o T cardíaca conjugada a una etiqueta detectable, donde dicha muestra de sangre, suero o plasma pasa desde dicho filtro al interior de dicha cámara de reacción mediante acción capilar;

15 una zona de captura configurada para inmovilizar, para la detección de la troponina I y/o T cardíaca complejada, al conjugado de anticuerpos, en la que la mezcla de reacción fluye desde dicha cámara de reacción a dicha zona de captura mediante acción capilar.

2. Dispositivo de inmunoensayo según la reivindicación 1, en el que el filtro ha sido secado después de aplicar troponina C.

20 3. Dispositivo de inmunoensayo según la reivindicación 1 ó 2, en el que la troponina C ha sido aplicada al filtro en una concentración desde 1 ng/ml a 1 mg/ml.

25 4. Dispositivo de inmunoensayo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la troponina C es troponina C humana o troponina C de conejo.

5. Dispositivo de inmunoensayo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que 0-1000 moles de calcio o magnesio han sido aplicados al filtro.

30

35

40

45

50

55

60

65