



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 32 299 T2** 2006.08.10

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 037 976 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 32 299.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IB98/02095**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 958 383.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/031235**

(86) PCT-Anmeldetag: **18.12.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **24.06.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.09.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **09.11.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.08.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/12** (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

993380 18.12.1997 US

(73) Patentinhaber:

Spectral Diagnostics Inc., Toronto, Ontario, CA

(74) Vertreter:

Witz, M., Dipl.-Chem., Pat.-Anw., 80993 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, IT, LI, NL, SE

(72) Erfinder:

**SHI, Qinwei, Etobicoke, CA; SONG, Qian-Li,
Mississauga, CA**

(54) Bezeichnung: **EINKETTIGE POLYPEPTIDE ENTHALTEND TROPONIN I UND TROPONIN C**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft rekombinant exprimierte, einkettige Polypeptide, welche die Troponin-Untereinheiten I und C umfassen, sowie ihre entsprechenden genetischen Sequenzen.

TECHNISCHER HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Eine frühe und genaue Bestimmung eines vermuteten akuten Herzinfarktes hängt in kritischer Weise von einer empfindlichen und spezifischen Bestimmung der Quantitäten von freigesetzten intrazellulären Herzmuskelkomponenten im Blut, Serum oder Plasma ab, um ein potentiell tödliches Ereignis, bei welchem ein Bedarf an Notfallmaßnahmen besteht, von nicht lebensbedrohenden Erkrankungen wie Angina und nicht herzspezifischem Brustschmerz wie z.B. Dyspepsie zu unterscheiden. Die frühen Veränderungen im Elektrokardiogramm sind weder in adäquater Weise spezifisch oder empfindlich genug und der medizinische Berufsstand vertraut mittlerweile im Hinblick auf eine frühzeitige Diagnose von Herzgewebeverletzungen auf biochemische Marker im Serum. Anfänglich wurden die Serummarker Kreatinkinase (CK) und insbesondere die herzspezifische CK-MB-Isoform verwendet und anschließend Myoglobin als ein empfindlicherer Frühindikator einer Herzschiädigung. In jüngerer Zeit wurden aufgrund ihrer hohen Spezifität der herzspezifische Troponinkomplex und seine Untereinheiten zu bevorzugten Markern von Herzmuskelschiädigung. Diese Tests erlauben in Kombination mit anderen Markern für Skelettmuskelschiädigung einen hohen Grad an diagnostischer Genauigkeit. Falls diese Tests in einer Krankenhaus-Notaufnahme durchgeführt werden, stellt eine frühe und genaue Diagnose einer Herzmuskelschiädigung einen großen Vorteil für ein vermutliches Opfer eines Herzanfalls dar.

[0003] Diagnostische Tests, welche herzspezifische Marker verwenden, werden beispielsweise in den US-Patenten Nr. 5,604,105 und 5,290,678 beschrieben. Diese und andere Verfahren erlauben eine rasche Diagnose eines Herzinfarktes im Umfeld einer Krankenhaus-Notaufnahme und bringen signifikante medizinische Vorteile für die Patienten. In diagnostischen Tests, in welchen die Konzentration von Troponin-Untereinheiten-Komplexen in Körperflüssigkeiten gemessen wird, werden häufig gereinigte Troponin-Untereinheiten oder -Komplexe als Antigene für die Herstellung von Antikörpern, welche in der Testprozedur verwendet werden, verwendet, sowie gereinigte Untereinheiten oder Komplexe, welche als Kontrollsubstanzen und zur Kalibrierung zur Durchführung des Assays verwendet werden. Assay-Kalibrierungsmittel werden zur Herstellung einer Verdünnungsserie verwendet, in welcher eine Standardkurve über den Betriebsbereich des Assays angefertigt wird; Assay-Kontrollen werden verwendet, um zu bestätigen, dass das Assay angemessen arbeitet, indem sichergestellt wird, dass die Messwerte von im Voraus festgelegten Proben in akzeptierbarem Abstand von den angegebenen Werten liegen. Um das Assay in annehmbarer Weise zu kalibrieren, müssen die Troponin-Kontrollsubstanzen und -Kalibratoren stabil bleiben und in einer Form vorliegen, welche durch den Antikörper immunologisch detektiert werden kann.

[0004] WO-A97/39132 beschreibt ein Assay zur Messung der Troponin-Blutkonzentration unter Verwendung eines rekombinanten Fusionsproteins, welches herzspezifisches Human-Troponin I und herzspezifisches Human-Troponin C enthält, welche als ein einzelnes Protein exprimiert werden, worin der N-Terminus herzspezifisches Human-Troponin I und der C-Terminus herzspezifisches Human-Troponin C ist.

[0005] Troponin ist ein Muskelprotein, welches in integraler Weise in der Kalzium abhängigen Regulierung der Muskelkontraktion involviert ist. Troponin liegt sowohl im Herzmuskel als auch im Skelettmuskel als ein nicht kovalent gebundener Komplex von drei Untereinheiten vor, nämlich den Isoformen des Troponins C, d.h. der Kalzium bindenden Untereinheit, dem Troponin I, d.h. der inhibierenden Untereinheit, und dem Troponin T, welches den Troponin-Komplex am Tropomyosin lokalisiert. Unter geeigneten Bedingungen assoziieren die Troponin-Untereinheiten in vitro spontan unter Bildung von nicht kovalent gebundenen Komplexen wie z.B. Troponin I und C sowie Troponin I, C und T. Es existieren Unterschiede zwischen den Aminosäure-Sequenzen der Troponin-Isoformen des Herzmuskels und des Skelettmuskels.

[0006] Im Falle einer Herzmuskelverletzung oder Nekrose tritt Troponin aus dem Herzgewebe in den Blutstrom aus, wobei seine empfindliche Bestimmung bei der Diagnose eines Herzanfalls hilfreich ist. Die Unterschiede in den Aminosäure-Sequenzen zwischen den Herzmuskel- und Skelettmuskel-Isoformen der Troponin-Untereinheiten werden in diagnostischen Tests ausgenutzt, in welchen die herzspezifische Isoform der Troponin-Untereinheiten und -Komplexe gemessen wird. Es stehen diagnostische Tests für herzspezifisches Troponin I zur Verfügung.

[0007] Troponin I weist indessen eine inhärent schlechte strukturelle Stabilität auf und unterliegt proteolytischer Spaltung durch Proteasen, welche in biologischen Proben vorhanden sind. Ein Troponin I-Standard, welcher in einer Körperflüssigkeitsmatrix hergestellt ist, unterliegt daher strukturellen Veränderungen und einem Abbau und ist daher als Kalibrator oder Kontrollsubstanz ungeeignet. Darüber hinaus ist bekannt, dass die inhärent stabileren Troponin-Komplexe bei der Lagerung dissoziieren und somit für einen proteolytischen Abbau zugänglich werden. Im Falle des Troponin I muss dieses mit Troponin C komplexiert werden, um dessen Konformationsstruktur und Stabilität aufrecht zu erhalten; aufgrund der Natur der Affinitäten der Untereinheiten im Komplex ist jedoch der Anteil an Troponin I, welcher in Form eines Komplexes vorliegt, konzentrationsabhängig. Dies schränkt seine Verwendbarkeit als Assay-Kalibrator oder -Kontrollsubstanz ein. Das Ausmaß der Interaktionen zwischen den Untereinheiten kann aus der Dissoziationskonstante K_d [wie beispielsweise in Biochemistry 33: 12729 [1994] berichtet wird] berechnet werden. Gemäß Berechnung und experimenteller Messung würde nur eine begrenzte Menge von Troponin I an Troponin C gebunden sein, was insbesondere in dem Bereich gilt, in welchem dieses in Patienten-Serumproben gefunden würde, und somit den Konzentrationen, für welche Kalibratoren und Kontrollsubstanzen verwendet werden müssen. So ist beispielsweise bei 50 ng/ml, was den oberen Bereich der meisten Troponin I-Assays darstellt, lediglich 10% des Troponin I an Troponin C gebunden, wenn diese beiden Untereinheiten in einem Verhältnis von 1:1 vorliegen. Bei einem 10fach höheren Verhältnis von Troponin C zu Troponin I sowie in der Gegenwart von zweiwertigen Kationen wurde lediglich die minimale Stabilität des Komplexes in der Kälte (Larue et al., US-Patent 5,583,200) von "zumindest einem Tag" beansprucht. Wenn höhere Konzentrationen des Komplexes aufrecht erhalten werden, steigt der Assoziierungsanteil an; nach einer Verdünnung auf eine Konzentration, welche zur Kalibrierung eines Assays notwendig ist, dissoziieren die Untereinheiten jedoch und werden immunologisch instabil. Durch die Dissoziation werden die Untereinheiten sodann einem proteolytischen Angriff ausgesetzt, welcher den Nutzen solcher Kalibratoren und Kontrollsubstanzen verringert.

[0008] Daher besteht ein Bedürfnis an stabilen Troponin-Kalibratoren und -Kontrollsubstanzen, um den Ansprüchen der Industrie entgegen zu kommen.

[0009] Es wurden zahlreiche Troponin-Zusammensetzungen aus natürlichen und rekombinanten Quellen beschrieben, welche Troponin I zusammen mit Troponin C enthalten. Malnic und Reinach (1994, Eur. J. Biochem., v. 222, S. 49–54) stellten in vivo einen rekombinanten Komplex her, in dem alle drei Hühner-Skelettmuskel-Troponin-Untereinheiten in ein oder mehrere Expressionsplasmide kloniert wurden. Innerhalb dieses Expressionsvektors hatte jedes Troponin-Gen seinen eigenen Promotor und die Proteine wurden innerhalb eines Bakteriums als individuelle Troponin-Untereinheiten exprimiert, welche anschließend innerhalb des Bakteriums Komplexe bildeten. Fujita-Becker et al. (1993, J. Biochem., Band 114, S. 438–444) beschrieb die Rekonstitution eines Kaninchen-Skelettmuskel-Troponin-Komplexes aus in E. coli exprimierten Untereinheiten. Es konnte bei keinem dieser rekombinanten Produkte gezeigt werden, dass diese zur Verwendung als Diagnostik-Standard oder -Kalibrierungssubstanz adäquate Stabilität aufweisen. Wie oben erwähnt wurde, sind selbst die Komplexe aus Troponin-Untereinheiten nicht stabil und werden in einer Lösung nicht in großem Umfang aneinander gebunden bleiben.

[0010] Wie weiter unten gezeigt wird, besteht eine prinzipielle Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, eine stabile Troponin-Zubereitung für Assays und andere Verwendungen zur Verfügung zu stellen, welche Troponin I und Troponin C in einer einzelnen Polypeptid-Kette umfasst und als ein rekombinantes Konstrukt hergestellt wird, welches in einem bakteriellen Expressionssystem als einzelnes Polypeptid exprimiert wird. Die vorliegende Erfindung unterscheidet sich von Troponin-Untereinheiten und ihren Fragmenten, welche für biochemische Studien chemisch vernetzt wurden, wobei Verfahren wie z.B. Carbodiimid-Vernetzung und photochemische Vernetzungschemie verwendet wurden, wie z.B. von Jha et al. (1996, Biochemistry, Band 35, S. 11026–11035), Kobayashi et al. (1996, Biochem. Biophys. Acta, Band 1294, S. 25–30) und Kobayashi et al. (1995, Biochemistry, Band 34, S. 10946–10952) beschrieben wurden. In diesen Literaturstellen wurden spezifische Fragmente von unterschiedlichen Troponin-Proteinen chemisch zur Untersuchung der Konformation der Untereinheiten und ihrer natürlichen Wechselwirkungen in Troponin-Komplexen chemisch vernetzt.

[0011] Daher besteht ein Bedürfnis an einem Troponin-Material, welches die Stabilitätsanforderungen erfüllt, leicht herzustellen und zu reinigen ist, und welches als ein Antigen und als Kontrollsubstanz und Kalibrator für Troponin-Assays verwendet werden kann. Da keine allgemein akzeptierte Kontrollsubstanz oder Kalibrator für Troponin existiert, ist es nicht möglich, diese Assays zwischen den einzelnen Laboratorien oder auch nur zwischen den einzelnen Instrumenten zu standardisieren, weil jedes bestimmte Troponin-Assay zusammen mit seinen Kontrollsubstanzen und Kalibratoren Ergebnisse produziert, welche dem Laboratorium und der Auswahl der Assay-Komponenten zu eigen sind. Daher ist es gegenwärtig nicht möglich, normale und abnormale Bereich anzugeben, welche von allen Laboratorien oder Ärzten anerkannt würden. Daher existiert ein Bedürf-

nis an universellen Kalibratoren und Kontrollsubstanzen, welche für alle verfügbaren kommerziellen Assay-Instrumente verwendet werden können.

[0012] Es wurde nun gefunden, dass ein einkettiges Polypeptid, welches herzspezifisches Human-Troponin I und herzspezifisches Human-Troponin C umfasst, stabil und für die oben genannten Zwecke geeignet ist. Darüber hinaus muss dieses Produkt vom Fachmann leicht herstellbar sein. Die Leichtigkeit der Herstellung maximiert die Reproduzierbarkeit der erfindungsgemäßen Produkte.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0013] Es ist eine prinzipielle Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein einkettiges Polypeptid bereitzustellen, welches Troponin I und Troponin C umfasst. Die Anwesenheit von Troponin I und Troponin C in derselben Polypeptid-Kette verleiht dem Produkt Konformationsstabilität und Immunstabilität. Das einkettige Polypeptid kann vorzugsweise eine Linker-Sequenz enthalten, die zwischen den Sequenzen von Troponin I und Troponin C positioniert ist. Die Sequenz des Linker-Peptids ist so gewählt, dass sie nicht die Tertiär-Struktur des Produktes und somit dessen im Vorgehenden benannten Anwendungen behindert. Ein einkettiges Polypeptid, in welchem Troponin I und Troponin C verbunden sind, wahlweise mittels eines Linker-Peptids, ergibt ein stabiles, reproduzierbares und leicht zu reinigendes Material zur Entwicklung von Troponin-Assays, ein Antigen zur Herstellung von Troponin-Antikörpern sowie Material zur Verwendung als Kontrollsubstanzen und Kalibratoren für Troponin-Assays.

[0014] Das einkettige Polypeptid der vorliegenden Erfindung wird besonders einfach mittels Rekombinationsmethoden hergestellt, indem ein replizierbares Klonierungs- oder Expressionsvehikel wie z.B. ein Plasmid, welches die genetische Sequenz des einkettigen Polypeptids trägt, hergestellt wird und eine Wirtszelle wie z.B. E. coli mit dem Vehikel oder Plasmid transformiert wird und das Polypeptid mittels der Wirtszelle exprimiert wird. Das einkettige Konstrukt enthält vorzugsweise eine Linker-Peptidsequenz zwischen der Troponin I und Troponin C-Aminosäure-Sequenz, wobei diese Sequenz mittels Rekombinationsmethoden eingeführt wird. Es können bestimmte Modifikationen in der genetischen Sequenz der Troponin-Moleküle vorgenommen werden, und zwar mit oder ohne Veränderungen der nachfolgenden Aminosäure-Sequenz des Polypeptids, um die Expression des Polypeptids in der Wirtszelle zu verbessern. Diese Veränderungen haben keinen Einfluss auf die Anwendung des einkettigen Polypeptids zur Verwendung für die oben genannten Zwecke.

[0015] Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine genetische Sequenz für ein einkettiges Polypeptid bereitzustellen, welche die genetischen Sequenzen von Troponin I und Troponin C umfasst. Die genetische Sequenz kann weiterhin eine genetische Linker-Sequenz beinhalten, welche zwischen den genetischen Sequenzen von Troponin I und Troponin C positioniert ist. Es kann eine Wirtszelle mit dem replizierbaren Klonierungs- oder Expressionsvehikel transformiert werden, welches die oben genannte genetische Sequenz enthält. Wie weiter oben erwähnt wurde, können bestimmte Veränderungen der genetischen Sequenz der Troponine vorgenommen werden, um die Expression der Wirtszelle zu erleichtern.

[0016] Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Wirtszelle bereitzustellen, welche ein Klonierungs- oder Expressionsvehikel oder ein Plasmid enthält, das die genetische Sequenz für eine einkettige Polypeptid-Kette trägt und die genetischen Sequenzen von Troponin I und Troponin C umfasst und zur Expression eines einkettigen Polypeptids, welches Troponin I und Troponin C umfasst, befähigt ist.

[0017] Diese und weitere Aspekte der vorliegenden Erfindung werden unter Bezugnahme auf die nachfolgenden Zeichnungen und die detaillierte Beschreibung näher erläutert.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0018] **Fig. 1** zeigt die DNA- und Aminosäure-Sequenz (SEQ-ID-NR: 3 bzw. SEQ-ID-NR: 4) eines einkettigen Polypeptids, welches Troponin I und Troponin C umfasst, die durch eine Linker-Peptidsequenz von 19 Aminosäureresten getrennt sind. Die Nukleotide 1 bis 630 umfassen Troponin I, die Nukleotide 631 bis 687 umfassen die Linker-Peptidsequenz und die Nukleotide 688 bis 1170 umfassen Troponin C.

[0019] **Fig. 2** zeigt die Ergebnisse von stündlich durchgeführten Troponin I-Assays eines Patienten, der einen Herzanfall durchmacht. Das Troponin I wurde unter Verwendung der Stratus (R)-, Access(R)- und Opus(R)-Assays gemessen.

[0020] **Fig. 3** zeigt die bei 4°C gemessene zeitliche Stabilität von verschiedenen Präparaten, welche Troponin

I, d.h. rekombinantes Troponin I, einen nicht kovalenten Komplex von Troponin I und Troponin C und ein einkettiges Polypeptid der vorliegenden Erfindung, welches Troponin I und Troponin C umfasst, enthalten.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0021] Die Messung des mit dem Herzmuskel assoziierten Proteins Troponin im Blutstrom hat sich als ein früher und spezifischer Indikator für einen vermuteten akuten Herzinfarkt erwiesen. Verfahren zur raschen und genauen Bestimmung von Troponin und seiner Untereinheiten im Blut wurden und werden als solche zur Diagnose von Herzinfällen unter Notfallbedingungen entwickelt, wodurch zahllose Leben gerettet wurden und auch in Zukunft gerettet werden. Um indessen genaue und verlässliche diagnostische Assays zu entwickeln und um die Validität dieser Assays unter Verwendung von Assay-Kontrollsubstanzen und -Kalibratoren sicher zu stellen, ist die Verfügbarkeit von stabilen, qualitativ hochwertigen herzspezifischen Human-Troponin-Kontrollsubstanzen und -Kalibratoren kritisch für die Zwecke der Qualitätskontrolle und der Tests sowie als Troponin-Antigene zur Entwicklung von Antikörpern für die Assays. Darüber hinaus ergeben, obwohl kommerzielle Assay für Troponin entwickelt wurden und noch entwickelt werden, diese Assays unterschiedliche Ergebnisse für dieselben Proben. Die verschiedenen Instrumente und Assay-Methoden für Troponin im Zusammenhang mit dem Fehlen eines universellen Troponin-Standards hat die Entwicklung von allgemein akzeptierten Normalbereichen und abnormalen Bereichen der Troponin-Konzentrationen verhindert, so dass die Interpretation von Laborergebnissen verdunkelt wurde und klinische Tests unter Einbeziehung verschiedener Laboratorien, welche herzspezifische Marker involvieren, verhindert wurde. Diese Probleme können durch die Verfügbarkeit von universellen Troponin-Kontrollsubstanzen oder -Kalibratoren gelöst werden. Universelle Kontrollsubstanzen und Kalibratoren wären in allen verfügbaren Assays bestimmbar und könnten verwendet werden, um die von allen Troponin-Assays zur Verfügung gestellten Messergebnisse zu standardisieren.

[0022] Zum Zwecke als stabile Kalibratoren und Kontrollsubstanzen von Troponin-Assays verbessert die vorliegende Erfindung die inhärente Konformationsinstabilität und proteolytische Empfindlichkeit des freien Troponin I sowie die Instabilität der Assoziation im Troponin I-Troponin C-Komplex. Diese Verbesserung besteht in einem einkettigen Polypeptid, welches herzspezifisches Human-Troponin I und herzspezifisches Troponin C umfasst. Die Troponin-Untereinheiten sind somit kovalent durch eine Peptid-Bindung verbunden und sind in dem selben linearen Polypeptid angeordnet. Dieses Polypeptid stellt einen stabilen Troponin I-Troponin C-Komplex zur Verfügung, um dem Bedürfnis der Industrie entgegenzukommen. Das einkettige Polypeptid kann mittels Rekombinationsmethoden hergestellt werden und beinhaltet vorzugsweise eine Polypeptid-Linker-Sequenz, die zwischen den Troponin I- und Troponin C-Sequenzen positioniert ist. Die Länge und Sequenz dieser Linker-Sequenz ist nur durch die Forderung limitiert, dass sie nicht die immunologische Detektierbarkeit des Produkts und seine weiteren oben genannten Anwendungen behindert.

[0023] So kann beispielsweise eine Ausführungsform des einkettigen Troponin I-Troponin C-Polypeptids die Troponin I-Sequenz am N-Terminus des Polypeptids umfassen, wobei der C-Terminus der Troponin I-Sequenz mittels einer Peptid-Bindung mit dem N-Terminus der Troponin C-Sequenz verbunden ist. In einer zweiten, bevorzugten Ausführungsform, in welcher eine Peptid-Linker-Sequenz zwischen den Troponin I- und Troponin C-Aminosäure-Sequenzen positioniert ist, umfasst eine bevorzugte Anordnung die Troponin I-Sequenz am N-Terminus des Polypeptids, deren C-Terminus mittels einer Peptid-Bindung mit dem N-Terminus des Linker-Peptids verbunden ist, wobei der C-Terminus des Linker-Peptids dann mittels einer Peptid-Bindung mit dem N-Terminus der Troponin C-Sequenz verbunden ist. Ein Beispiel dieses Konstrukts ist die Aminosäure-Sequenz, welche in SEQ-ID-NR: 4 abgebildet ist. In diesem Beispiel ist die Aminosäure-Sequenz des Linkers in der SEQ-ID-NR: 2 repräsentiert. Diese enthält 19 Aminosäuren.

[0024] Die Aminosäure-Sequenzen in den obigen Beispielen entsprechen den Nukleotid-Sequenzen der cDNA, die für diese Polypeptide kodiert. Die genetische Sequenz im ersten Beispiel umfasst die genetische Sequenz von Troponin I am 5'-Ende der cDNA, wobei sich an dessen 3'-Ende unmittelbar das 5'-Ende der genetischen Troponin C-Sequenz anschließt. In der bevorzugten Ausführungsform, in welcher ein Linker zwischen den Troponin I- und Troponin C-Sequenzen positioniert ist, beginnt das 5'-Ende der cDNA-Sequenz mit der genetischen Troponin I-Sequenz, auf dessen 3'-Ende das 5'-Ende der optionalen, dazwischen positionierten genetischen Linker-Sequenz folgt, auf dessen 3'-Ende das 5'-Ende der genetischen Troponin C-Sequenz folgt, die am 3'-Ende der cDNA endet. Die genetische Sequenz des oben genannten spezifischen Beispiels wird in der SEQ-ID-NR: 3 wiedergegeben. Die cDNA-Sequenz des Linkers wird in SEQ-ID-NR: 1 wiedergegeben.

[0025] Wie oben beschrieben wurde, ist die Auswahl der Länge und der spezifischen Sequenz des optionalen Linker-Polypeptids nur dadurch limitiert, dass es nicht die immunologische Detektierbarkeit des Troponin I und Troponin C im einkettigen Polypeptid behindert. Es wird angenommen, dass die Troponin I- und Troponin

C-Segmente des einkettigen Polypeptids bei einer geeigneten Linker-Sequenz untereinander in ähnlicher Art und Weise assoziieren wie sie dies in einem nicht kovalenten Troponin I-Troponin C-Komplex tun, und das die Befestigung der Untereinheiten im einkettigen Polypeptid die Konformation der Assoziation und damit eine konsistente immunologische Detektierbarkeit des Troponins beibehält. Darüber hinaus ist ein Troponin I-Troponin C-Komplex, welcher auf diese Art und Weise stabilisiert ist, gegenüber einem proteolytischen Angriff in der Anwesenheit von Körperflüssigkeiten und anderen Komponenten weniger empfindlich. In dieser bevorzugten Ausführungsform wird ein Linker von ungefähr 6 bis ungefähr 50 Aminosäuren (und einer entsprechenden Anzahl von Kodons in der cDNA) im Hinblick auf eine einfache und ökonomische Herstellung bevorzugt.

[0026] Es wird bevorzugt, das einkettige Troponin I-Troponin C-Polypeptid der vorliegenden Erfindung mit einem relativ kurzen Linker-Segment herzustellen, da bei solchen Produkten eine geringe oder keine Interferenz mit der Tertiärstruktur des Produktes vorliegt. Daher besteht eine geringe oder keine Interferenz mit der Verfügbarkeit von Epitopen für eine Reaktion mit leicht erhältlichen Antikörpern. Es ist bekannt, dass im gewöhnlichen Troponin I-Troponin C-Komplex der Amino-Terminus der Troponin I-Komponente relativ nahe am Carboxy-Terminus der Troponin C-Komponente angeordnet ist. Falls sich diese Einheiten jedoch ohne einen Linker bilden, kann diese Nähe gestört werden und die resultierende Spannung in der Tertiärstruktur führt dazu, dass einige Epitope nicht mehr für eine Reaktion zur Verfügung stehen. In ähnlicher Weise können Linker, welche zu lang sind, die Tertiärstruktur modifizieren oder der Linker selbst kann einige Epitope verdecken.

[0027] Eine nützliche Polypeptid-Linker-Sequenz ist beispielsweise $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$, welche eine flexible Peptid-Sequenz darstellt, die es den beiden Untereinheiten erlaubt zu assoziieren. Um die genetische Sequenz mit einem Linker zu konstruieren, sind an beiden Enden des Linkers zwei zusätzliche Codons anwesend, welche benötigt wurden, um eindeutige Restriktionsstellen zu schaffen, um das genetische Konstrukt des gewünschten einkettigen Polypeptids zu schaffen. In einem Beispiel können Codons, welche am N-Terminus des Linkers Thr-Ser und am C-Terminus Ala-Cys entsprechen, beinhaltet sein. Somit kann ein geeigneter Linker mit 19 Resten hergestellt werden (genetische Sequenz: SEQ-ID-NR: 1 und Peptid-SEQ-ID-NR: 2).

[0028] Es können rekombinante Verfahren verwendet werden, um die DNA-Sequenz herzustellen, welche die Troponin-Untereinheiten und die optionale Linker-Sequenz umfassen, und um diese Sequenz in eine Wirtszelle einzuführen, und es werden standardisierte Expressionsverfahren verwendet, um das rekombinante Polypeptid zu exprimieren und zu reinigen. Diese verfahren ähneln Verfahren, welche zur Herstellung von Fusionsproteinen verwendet werden, welche beispielsweise für zwei metabolisch gekoppelte Hefeenzyme, nämlich Citrat-Synthase und Malat-Dehydrogenase (Lindblad et al., Biochemistry 33: 11692–11698 [1994]), beschreiben werden; bei der Herstellung von einkettigen Polypeptiden, welche Antigen-Bindungsstellen von Antikörpern umfassen (US-Patent 4,946,778); sowie bei der Herstellung von Fusionsproteinen zum Phagen-Display (US-Patent 5,516,637). Diese Verfahren sind dem Fachmann bekannt.

[0029] Für den Fall, dass keine Linker-Sequenz gewünscht wird, können die Troponin I- und Troponin C-cDNA-Sequenzen mittels geeigneter Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, miteinander verbunden werden, wie z.B. dem SOE-Verfahren, in welchem Paare von teilweise überlappenden Primern verwendet werden, das beispielsweise von Hu et al. (1996, Protein Expression and Purification 7: 289–293) beschrieben wird, in welchem seltene Codons im herzspezifischen Human-Troponin T durch synonyme, verbreitete Codons ersetzt wurden. Diese Verfahren sind ebenfalls dem Fachmann bekannt.

[0030] Das rekombinante Konstrukt wird als ein Expressions- oder Klonierungsvehikel oder Plasmid hergestellt und zur Expression in eine Wirtszelle eingeführt. Verfahren zur Expressierung von rekombinanten Proteinen sind im Stand der Technik bekannt. Sobald das einkettige Polypeptid exprimiert ist, kann es mittels standardisierten Protein-Reinigungsverfahren gereinigt werden.

[0031] Darüber hinaus können die genetischen Sequenz von Troponin I und Troponin C modifiziert werden, um die Expression des einkettigen Polypeptids in einem bakteriellen Expressionssystem zu verbessern. Diese genetischen Veränderungen können aber brauchen nicht die Aminosäure-Sequenz des Polypeptids verändern. Wie im Stand der Technik bekannt ist, verringern seltene Codons, welche in einem Expressionsvehikel vorhanden sind, die Effizienz der Expression; durch einen Austausch dieser Codons durch synonyme, verbreitete Codons wird die bakterielle Expression verbessert (was beispielsweise im Hinblick auf Troponin I in der gleichzeitig anhängigen, am 23. Mai 1997 hinterlegten Anmeldung mit der Serien-Nr. 08/862,613 und in den oben erwähnten Verfahren von Hu et al. beschrieben wird). Zusätzlich verbessert der Anschluss einer kurzen Nukleotid-Sequenz am 5'-Ende der Troponin I-cDNA (wie dies in der Anmeldung mit der Serien-Nr. 08/862,613 beschrieben wird) die bakterielle Expression und stellt ein Troponin I-Polypeptid mit sechs zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren zur Verfügung. Diese optionalen Veränderungen zur Verbesserung der bakteriellen Ex-

pression schmälern nicht den Nutzen des einkettigen Polypeptids für die oben genannten Zwecke.

[0032] Es sind mehrere Troponin I-Assays kommerziell erhältlich, welche alle unter Verwendung verschiedener Formate, Instrumente und Assay-Kontrollsubstanzen und Kalibratoren operieren. So verwendet beispielsweise das Stratus(R)-Troponin I-Assay von Dade einen monoklonalen Einfang- und einen monoklonalen Detektor-Antikörper. Das Kalibrator/Kontroll-Substanz-Material ist ein N-terminales Peptid aus herzspezifischem Human-Troponin I. Der Operationsbereich des Assays liegt bei 0 bis 50 ng/ml, wobei die Empfindlichkeit 0,6 ng/ml beträgt und der cut-off-Wert 1,5 ng/ml beträgt. Das Access(R)-Troponin I-Assay von Sanofi verwendet ebenfalls einen monoklonalen Einfang- und einen monoklonalen Detektor-Antikörper, wobei indessen der Kalibrator/die Kontrollsubstanz ein Komplex aus nativem herzspezifischem Troponin I und Troponin C ist. Dieses Assay hat einen Betriebsbereich von 0 bis 50 ng/ml, eine Empfindlichkeit von 0,03 ng/ml und einen cut-off-Wert von 0,1 ng/ml. Das Opus(R)-Troponin I-Assay von Behring verwendet polyklonale Antikörper sowohl als Einfang- und Detektor-Antikörper und hat einen Bereich von 0–300 ng/ml, eine Empfindlichkeit von 1 ng/ml und einen cut-off-Wert von 2 ng/ml.

[0033] Aufgrund der Unterschiede in den Methoden und Komponenten der oben genannten Assays sowie der Kalibratoren/Kontrollsubstanzen können diese nicht zwischen den Assays ausgetauscht werden. So sind beispielsweise die Kalibratoren/Kontrollsubstanzen des Stratus(R), welche ein N-terminales Peptid des herzspezifischen Troponin I verwenden, in den Access(R)- und Opus(R)-Assays nicht detektierbar, da die Antikörper der letztgenannten Assays nicht auf denselben N-terminalen Peptidanteil des in den Kontrollsubstanzen/Kalibratoren verwendeten Troponin I gerichtet sind. Andererseits ergeben die Kontrollsubstanzen des Access(R)-Assays, welche im Access(R)-Assay mit der höchsten Empfindlichkeit und dem höchsten cut-off-Wert aller drei Assays detektierbar sind, einen etwa vierfach höheren Messwert im Opus(R)-Assay. Im Gegensatz dazu werden die Kontrollsubstanzen des Opus(R)-Assays im Stratus(R)-Assay nur schlecht nachgewiesen. Diese Ergebnisse zeigen, dass es nicht möglich ist, die Kalibratoren/Kontrollsubstanzen der Assays zwischen den Assays untereinander auszutauschen, und dass die Werte, welche von den Kontrollsubstanzen des Assays eines Herstellers erhalten werden, nur zur Interpretation von Messungen, die auf dem selben Assay durchgeführt werden, herangezogen werden können. Das Vorliegen dieser schlechten Relation wird weiterhin durch die in [Fig. 2](#) gezeigte grafische Abbildung untermauert, welche die unter Verwendung der Access(R)-, Stratus(R)- und Opus(R)-Assays bei einem einen Herzanfall durchmachenden Patienten nacheinander gemessenen Troponin I-Konzentrationen zeigt. Obwohl, wie gezeigt wird, alle drei Assays einen unterscheidbaren Anstieg und Abfall der Troponin I-Konzentrationen innerhalb der ersten und der sechsten Stunde anzeigen, sind die absoluten Troponin I-Werte zu jedem Zeitpunkt höchst unterschiedlich.

[0034] Diese großen Unterschiede können der Individualität der Assays sowie ihrer Kalibratoren/Kontrollsubstanzen zugeordnet werden, wie oben ausgeführt wurde.

[0035] Ein einkettiges Polypeptid nach der vorliegenden Erfindung, welches Troponin I und Troponin C umfasst, kann außerdem zur Reinigung von Proteinen und anderen Substanzen einschließlich Antikörpern mit einer Affinität zur Bindung an Troponin I oder Troponin C verwendet werden. Das einkettige Polypeptid der vorliegenden Erfindung kann beispielsweise kovalent an eine unlösliche Matrix oder ein Polymer gebunden und in einer Chromatographiesäule angeordnet werden. Man kann einen Zell- oder Gewebeextrakt, bei welchem der Verdacht besteht, dass er ein Material, welches Troponin bindet, oder ein gegen Troponin herangezogenes Antikörper-Präparat enthält, durch die Säule durchlaufen lassen, wobei dieses am kovalent gebundenen Polypeptid anhaften würde. Nach einem waschen der Matrix kann das anhaftende Material unter Verwendung einer konzentrierten Salzlösung, eines chaotropen Mittels oder unter Anwendung von bei der Proteinreinigung verwendeten standardisierten Verfahren eluiert werden.

[0036] Ein einkettiges Polypeptid der vorliegenden Erfindung kann außerdem für die Herstellung von monoklonalen oder polyklonalen, gegen Troponin gerichteten Antikörper nützlich sein, wobei standardisierte Verfahren zur Immunisierung von Tieren oder zur Herstellung von Hybridoma-Zellen verwendet werden.

[0037] Das einkettige Polypeptid der vorliegenden Erfindung, welches Troponin I und Troponin C umfasst, kann für die Herstellung empfindlicher Troponin-Assays und die Kalibrierung solcher Assays verwendet werden. Wie in den nachfolgenden, nicht limitierenden Beispielen gezeigt wird, zeigt das einkettige Polypeptid eine im Vergleich zu anderen Troponin-Kalibratoren überlegene Leistung.

Beispiel 1

Expression eines einkettigen herzspezifischen Human-Troponin I-Troponin C-Polypeptids in E. coli

[0038] Es wurden cDNAs für herzspezifisches Human-Troponin I und Troponin C mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kloniert, wobei Primer verwendet wurden, welche an Hand der veröffentlichten herzspezifischen Troponin I-cDNA-Sequenz (Vallins et al., FEBS Letters 270, 57–61 (1990)) und der Troponin C-Sequenz (GenBank AC: C07897) entwickelt wurden. Der C-Terminus der Troponin I-cDNA wurde mit dem N-Terminus der Troponin C-cDNA über einen synthetischen Linker verbunden, welcher für $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ kodiert [Gen- und Peptid-Sequenz nach SEQ-ID-NR: 1 bzw. SEQ-ID-NR: 2] mit einer an jedem Ende konstruierten eindeutigen Restriktionsstelle. Das einkettige Troponin I-C-cDNA-Konstrukt wurde mittels DNA-Sequenzierung bestätigt und in den Expressionsvektor pET21 (Novagen) kloniert. E. coli-BL21(DE3)-Zellen, welche auch von Novagen erhältlich sind, wurden mit dem resultierenden Plasmid transformiert und die Protein-Expression wurde sowohl mit SDS-PAGE und Immunoassays verifiziert. Das oben beschriebene einkettige Polypeptid hat ein Molekulargewicht von 43.700 Dalton. Die Gen- und Polypeptid-Sequenzen sind in SEQ-ID-NR: 3 bzw. SEQ-ID-NR: 4 wiedergegeben.

Beispiel 2

Stabilität und Nutzen des Polypeptids im Troponin-Assay

[0039] Das in Beispiel 1 beschriebene einkettige Troponin I-C sowie ein aus nativem herzspezifischem Troponin I und Troponin C gebildeter Komplex wurden mit den Assays Stratus(R) und Access(R) ausgewertet, wobei bei jedem Assay die jeweiligen, vom Hersteller angegebenen Verfahren befolgt wurden. Die Resultate sind wie folgt:

Troponin-Zusammensetzung	Stratus(R) (ng/ml)	Access(R) (ng/ml)
Nativer, herzspezifischer Troponin I-Troponin C-Komplex	7,9	5
Einkettiges Polypeptid, umfassend Troponin I und Troponin C nach Beispiel 1	8	3,8

[0040] Diese Ergebnisse zeigen, dass das einkettige Polypeptid, welches Troponin I und Troponin C umfasst, Resultate ergab, welche den Resultaten für den nativen, herzspezifischen Troponin I-Troponin C-Komplex ähnelten, wobei das Stratus(R)-Assay sich ähnelnde höhere Werte und das Access(R)-Assay sich ähnelnde niedrigere Werte produzierten.

Beispiel 3

Stabilität des einkettigen Troponin I-C-Polypeptids

[0041] Die Stabilität von drei Präparaten, welche Troponin I enthielten, wurde während einer 7-tägigen Lagerung bei 4°C verfolgt. Die Präparate waren (1) rekombinantes, mittels standardisierter Verfahren hergestellte Troponin I; (2) ein nicht kovalent gebundener Komplex von rekombinantem Troponin I und rekombinantem Troponin C und (3) das in SEQ-ID-NR: 4 gezeigte einkettige Polypeptid, welches Troponin I und Troponin C mit einem dazwischen positioniertem Linker-Peptid umfasst. Der nicht kovalent-gebundene Komplex von rekombinantem Troponin I und rekombinantem Troponin C wurde mittels den in unseren US-Patenten Nr. 5,834,210 und 6,060,278, hinterlegt am 31. Oktober 1997, veröffentlichten Verfahren hergestellt.

[0042] Kurz gesagt, es wurde herzspezifisches Human-Troponin C und modifiziertes Troponin I in E. coli exprimiert. Das Troponin I war als rekombinantes Produkt mit sechs zusätzlichen N-terminalen-Aminosäure-Sequenz konstruiert, um seine Expression zu erhöhen; das Troponin C wurde in seiner nativen Aminosäure-Sequenz exprimiert. Das modifizierte Troponin I wurde in Gegenwart von Harnstoff mit Troponin C, CaCl_2 und

MgCl₂ kombiniert und vorsichtig geschüttelt, um die Bildung des Troponin I-Troponin C-Komplexes zu fördern.

[0043] Die drei Präparate wurden in normalem Humanserum gelagert. Das Troponin wurde unter Verwendung des Stratus II (R)-Assays von Dade bestimmt.

[0044] Wie in [Fig. 3](#) gezeigt wird, weisen das rekombinante Troponin I und der rekombinante Komplex innerhalb einer 7-tägigen Periode unterschiedliche Detektierbarkeiten auf, wobei die Detektierbarkeit des ersteren zunächst ansteigt und dann abfällt und die Detektierbarkeit des letzteren im Verlauf der Testperiode langsam ansteigt. Diese Präparate waren somit instabil. Dem gegenüber blieb die immunologische Detektierbarkeit des einkettigen Troponin I-Troponin C-Peptids innerhalb der Testperiode konstant, was die Stabilität dieses Materials demonstriert.

Patentansprüche

1. Einkettiges Polypeptid, welches ein herzspezifisches Troponin I am N-Terminus umfasst, welches durch eine Peptidlinkersequenz mit einem herzspezifischen Troponin C am C-Terminus verbunden ist, wobei die Sequenz des Peptidlinkers in SEQ-ID-NR: 2 spezifiziert ist.
2. Einkettiges Polypeptid nach Anspruch 1, wobei das einkettige Polypeptid die in SEQ-ID-NR: 4 spezifizierte Sequenz umfasst.
3. Polynukleotid, welches das einkettige Polypeptid nach Anspruch 1 kodiert.
4. Polynukleotid nach Anspruch 3, wobei das kodierte einkettige Polypeptid die in SEQ-ID-NR: 4 spezifizierte Sequenz umfasst.
5. Polynukleotid nach Anspruch 4, wobei das Polynukleotid die in SEQ-ID-NR: 3 spezifizierte Sequenz umfasst.
6. Klonierungs- oder Expressionsvektor, welcher das Polynukleotid nach Anspruch 3 umfasst.
7. Mit dem Expressionsvektor nach Anspruch 6 transformierte Wirtszelle.
8. Wirtszelle nach Anspruch 7, bei welcher es sich um E. coli handelt.
9. Kontroll- oder Kalibrator-Zusammensetzung für ein Troponin I-Assay, welche das einkettige Polypeptid nach Anspruch 1 umfasst.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG.1A

ATG GCC GAC GGT TCC AGC GAT GCG GCT AGG GAA CCT CGC CCT GCA CCA	48
Met Ala Asp Gly Ser Ser Asp Ala Ala Arg Glu Pro Arg Pro Ala Pro	35
20 25 30	
GCC CCA ATC AGA CGC CGC TCC AAC TAC CGC GCT TAT GCC ACG GAG	96
Ala Pro Ile Arg Arg Arg Ser Ser Asn Tyr Arg Ala Tyr Ala Thr Glu	50
40 45	
CCG CAC GCC AAG AAA AAA TCT AAG ATC TCC GCC TCG AGA AAA TTG CAG	144
Pro His Ala Lys Lys Lys Ser Lys Ile Ser Ala Ser Arg Lys Leu Gln	65
55 60	
CTG AAG ACT CTG CTG CAG ATT GCA AAG CAA GAG CTG GAG CGA GAG	192
Leu Lys Thr Leu Leu Leu Gln Ile Ala Lys Gln Glu Leu Glu Arg Glu	80
70 75	
GCG GAG GAG CGG CGC GGA GAG AAG GGG CGC GCT CTG AGC ACC CGC TGC	240
Ala Glu Glu Arg Arg Gly Glu Lys Gly Arg Ala Leu Ser Thr Arg Cys	95
85 90	
CAG CCG CTG GAG TTG GCC GGG CTG GGC TTC GCG GAG CTG CAG GAC TTG	288
Gln Pro Leu Glu Leu Ala Gly Leu Gly Phe Ala Glu Leu Gln Asp Leu	115
100 105 110	

FIG.1B

TGC CGA CAG CTC CAC GCC CGT GTG GAC AAG GTG GAT GAA GAG AGA TAC 336
 Cys Arg Gln Leu His Ala Arg Val Asp Lys Val Asp Glu Glu Arg Tyr 130
 120 125

GAC ATA GAG GCA AAA GTC ACC AAG AAC ATC ACG GAG ATT GCA GAT CTG 384
 Asp Ile Glu Ala Lys Val Thr Lys Asn Ile Thr Glu Ile Ala Asp Leu 145
 135 140

ACT CAG AAG ATC TTT GAC CTT CGA GGC AAG TTT AAG CGG CCC ACC CTG 432
 Thr Gln Lys Ile Phe Asp Leu Arg Gly Lys Phe Lys Arg Pro Thr Leu 160
 150 155

CGG AGA GTG AGG ATC TCT GCA GAT GCC ATG ATG CAG GCG CTG CTG GCG 480
 Arg Arg Val Arg Ile Ser Ala Asp Ala Met Met Gln Ala Leu Leu Gly 175
 165 170

GCC CGG GCT AAG GAG TCC CTG GAC CTG CGG GCC CAC CTC AAG CAG GTG 528
 Ala Arg Ala Lys Glu Ser Leu Asp Leu Arg Ala His Leu Lys Gln Val 195
 180 185

AAG AAG GAG GAC ACC GAG AAG GAA AAC CGG GAG GTG GGA GAC TGG CGC 576
 Lys Lys Glu Asp Thr Glu Lys Glu Asn Arg Glu Val Gly Asp Trp Arg 210
 200 205

AAG AAC ATC GAT GCA CTG AGT GGA ATG GAG GGC CGC AAG AAA AAG TTT 624
 Lys Asn Ile Asp Ala Leu Ser Gly Met Glu Gly Arg Lys Lys Phe 225
 215 220

FIG.1C

GAG AGC ACT AGT GGT GGT GGT TCT GGT GGG GGG GGT TCT GGT GGC Glu Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly 230 235 240	672
GGT GGT TCT GCA TGC ATG GAT GAC ATC TAC AAG GCT GCG GTA GAG CAG Gly Gly Ser Ala Cys Met Asp Asp Ile Tyr Lys Ala Ala Val Glu Gln 245 250 255	720
CTG ACA GAA GAG CAG AAA AAT GAG TTC AAG GCA GCC TTC GAC ATC TTC Leu Thr Glu Glu Gln Lys Asn Glu Phe Lys Ala Ala Phe Asp Ile Phe 260 265 270 275	768
GTG CTG GGC GCT GAG GAT GGC TGC ATC AGC ACC AAG GAG CTG GGC AAG Val Leu Gly Ala Glu Asp Gly Cys Ile Ser Thr Lys Glu Leu Gly Lys 280 285 290	816
GTG ATG AGG ATG CTG GGC CAG AAC CCC ACC CCT GAG GAG CTG CAG GAG Val Met Arg Met Leu Gly Gln Asn Pro Thr Pro Glu Glu Leu Gln Glu 295 300 305	864
ATG ATC GAT GAG GTG GAC GAG GAC GGC AGC GGC ACC GTG GAC TTT GAT Met Ile Asp Glu Val Asp Glu Asp Gly Ser Gly Thr Val Asp Phe Asp 310 315 320	912

FIG.1D

GAG TTC CTG GTC ATG ATG GTT CGG TGC ATG AAG GAC GAC AGC AAA GGG. Glu Phe Leu Val Met Met Val Arg Cys Met Lys Asp Asp Ser Lys Gly 325 330 335	960
AAA TCT GAG GAG GAG CTG TCT GAC CTC TTC CGC ATG TTT GAC AAA AAT Lys Ser Glu Glu Glu Leu Ser Asp Leu Phe Arg Met Phe Asp Lys Asn	1008
GCT GAT GGC TAC ATC GAC CTG GAT GAG CTG AAG ATA ATG CTG CAG GCT Ala Asp Gly Tyr Ile Asp Leu Asp Glu Leu Lys Ile Met Leu Gln Ala 360 365 370	1056
ACA GGC GAG ACC ATC ACG GAG GAC GAC ATC GAG GAG CTC ATG AAG GAC Thr Gly Glu Thr Ile Thr Glu Asp Asp Ile Glu Glu Leu Met Lys Asp 375 380 385	1104
GGA GAC AAG AAC AAC GAC GGC CGC ATC GAC TAT GAT GAG TTC CTG GAG Gly Asp Lys Asn Asn Asp Gly Arg Ile Asp Tyr Asp Glu Phe Leu Glu 390 395 400	1152
TTC ATG AAG GGT GTG GAG TAG Phe Met Lys Gly Val Glu 405 410	1173

FIG. 2

Vergleich der Serum-cTnI-Assays

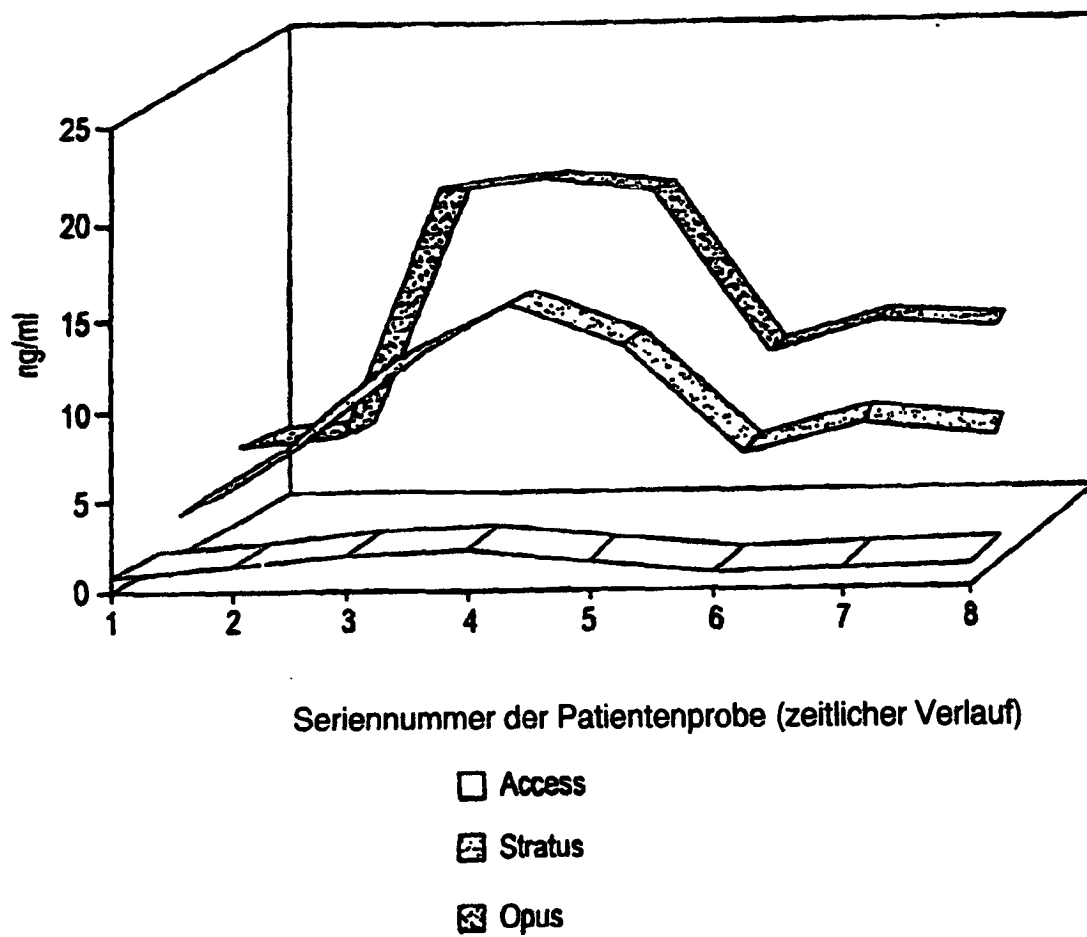


FIG. 3

Vergleich der Immunstabilitäten verschiedener TnI-Formen

