



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101994900349818
Data Deposito	22/02/1994
Data Pubblicazione	22/08/1995

Priorità	9302067
Nazione Priorità	FR
Data Deposito Priorità	

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	B		

Titolo

COMPOSIZIONE STABILIZZATA DI TROPONINA PER SAGGI IMMUNOLOGICI E PROCEDIMENTO DI STABILIZZAZIONE DI TROPONINA PER SAGGI IMMUNOLOGICI
--

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:

"Composizione stabilizzata di troponina per saggi immunologici e procedimento di stabilizzazione di troponina per saggi immunologici"

di: PASTEUR SANOFI DIAGNOSTICS, nazionalità francese, 3 Boulevard Raymond-Poincaré, 93430 Marnes la Coquette, Francia

Inventori designati: LARUE Cathérine, MARQUET Pierre-Yves

Depositata il: 22 febbraio 1994

TO 94A0001JJ

* * *

La presente invenzione riguarda una composizione stabilizzata di troponina usata come campione di riferimento nei saggi immunologici che dosano la troponina nel siero o il plasma sanguigno.

Si sa che la troponina è un complesso proteico miofibrillare, costituito da 3 proteine, le troponine C, I, T, che regola la contrazione del muscolo mediante il Ca^{++} , contrazione che risulta dalla interazione della miosina e della actina delle miofibrille.

Quando il muscolo è danneggiato, sia esso il muscolo cardiaco al momento di un infarto del miocardio, o il muscolo scheletrico, al momento di sforzi fisici prolungati, le proteine contrattili allora liberate appaiono più o meno rapidamente nella circolazione sanguigna.

Così si è recentemente proposta la determinazione delle troponine per la diagnosi precoce dell'infarto del miocardio,

sia esso quello della troponina T in Circulation 83 902-912 (1991) o della troponina I in Am. Heart J 110 1333-44 (1987) e Molecular Immunology 29 (2) 271-278 (1992).

Qualsiasi prova immunologica enzimatica o qualsiasi prova radioimmunologica praticata nei laboratori di patologia implica, generalmente, la fornitura da parte del fabbricante al lato dei reattivi necessari alla determinazione, cioè anticorpi marcati o non, traccianti e soluzioni di diluizione, di un campione del composto da determinare che, utilizzato in condizioni analoghe a quelle del campione da studiare, servirà da riferimento per il calcolo dei risultati e/o da controllo positivo.

Si sa che le proteine sono poco stabili in soluzione, e i reattivi che ne contengono sono frequentemente messi in commercio sotto forma liofilizzata, insieme ad un solvente, di opportuna composizione, nel quale dovranno essere sciolti da parte dell'utilizzatore prima dell'impiego; il mantenimento a 4°C delle soluzioni ottenute permette di utilizzarle per diversi giorni, anche se la taratura giornaliera dimostra una certa evoluzione delle concentrazioni del reattivo; generalmente, ed è quanto si suggerisce per la troponina T, le soluzioni di riferimento preparate partendo dal liofilizzato sono congelate, in dose unitaria.

Le soluzioni acquose tamponate di troponina, in particolare quelle di troponina I e T, possono essere conservate diversi mesi a -80°C, ma si è constatato che esse sono stabili solo per

INTER-ALFA
VIA C. CAVALLI
10121 TORINO

alcune ore a +4°C, anche qualora inibitori di proteasi o agenti antibatterici vi vengano aggiunti, il che obbliga i laboratori di patologia a preparare frequentemente, talvolta due volte al giorno, le loro soluzioni di taratura.

La presente invenzione permette la conservazione, per diversi giorni a +4°C, delle soluzioni campione più o meno diluite di troponina I o di troponina T che vengono usate come riferimento in prove immunologiche specifiche.

La composizione stabilizzata dell'invenzione comprende, in mezzo acquoso, una delle due troponine I o T secondo la determinazione da effettuare e da 1 a 10 equivalenti molari di troponina C e preferibilmente da 2 a 5 equivalenti, come pure una grande quantità di ioni Mg^{++} e/o Ca^{++} . Gli ioni Mg^{++} e/o Ca^{++} sono presenti sotto forma di sali, in particolare di cloruro, bromuro o nitrato. La quantità di sali di Mg^{++} e/o Ca^{++} , può essere da 100 a 10000 volte in peso quella della troponina I o della troponina T.

La troponina C può essere di origine umana o animale.

La concentrazione di troponina I o T nelle soluzioni secondo l'invenzione corrisponde a quelle generalmente utilizzate nei saggi immunologici, di regola è compresa tra 0,01 ng/ml e 1 µg/ml preferibilmente tra 0,2 ng/ml e 25 ng/ml, mentre la concentrazione di sali di Mg^{++} e/o Ca^{++} , che non è critica, potrà essere compresa tra 20 µM e 10 mM; in generale, questa concentrazione sarà vicina a 2 mM.

La soluzione può essere tamponata, in forma classica, ad un pH compreso tra 4 e 10, preferibilmente 5,5 e 7,5, ed il solvente può essere costituito parzialmente o nella sua totalità da plasma umano normale, in modo da avere un campione di riferimento che comprenda gli stessi componenti del campione da studiare, che contiene il plasma o il siero del paziente.

L'invenzione ha pure per oggetto una composizione di troponina I o T in polvere, preferibilmente sotto forma liofilizzata, comprendente eventualmente ioni Mg^{++} e/o Ca^{++} , come $CaCl_2$ e da 1 a 10 equivalenti molari di troponina C, sebbene in questo caso la presenza di troponina C sarà utile per assicurare la stabilità delle altre troponine solo a partire dal momento in cui la composizione sarà stata messa in una soluzione acquosa da parte dell'utilizzatore.

Qualora la composizione liofilizzata non contenga ioni Mg^{++} e/o Ca^{++} , questi saranno aggiunti al momento della messa in soluzione.

L'invenzione ha pure per oggetto un procedimento di stabilizzazione di una soluzione di troponina I o T per saggi immunologici, caratterizzato dal fatto che consiste nell'aggiungere da 1 a 10 equivalenti molari di troponina C per equivalenti molari di troponina I o T, e ioni Mg^{++} e/o Ca^{++} , per esempio $CaCl_2$.

In quanto segue, si descrivono esempi di realizzazione dell'invenzione e i risultati delle prove di conservazione

corrispondenti.

La troponina I (TnI) umana è stata isolata da un cuore con il metodo descritto in FEBS Lett. 40 253-257 (1974). La soluzione ottenuta può essere conservata diversi mesi a -80°C , ad una concentrazione superiore a $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ in un tampone fosfato salino contenente lo 0,5% di caseina.

La troponina T (TnT) può essere ottenuta come descritto in J. Biochem. 72, 723-735 (1972) o in J. Biol.Chem. 249, 4742-4748 (1974).

La troponina C (TnC) può essere isolata mediante il metodo descritto in Acta Chem. Scand. B 42; 211-215 (1988) partendo dal complesso delle tre troponine (T, C, I), di origine bovina, che è in vendita.

Le concentrazioni delle soluzioni preparate sono determinate con il reattivo di Bradford, descritto in Ann. Biochem 72, 248 (1976) e che è in vendita; il prodotto di riferimento è una nota miscela di troponina I, C e T, messa in commercio dalla società Sigma sotto forma liofilizzata con il riferimento T 4895.

Preparazione di una composizione secondo l'invenzione

- Composizione contenente 5 molecole di troponina C per molecola di troponina I.

Si introducono in $940\text{ }\mu\text{l}$ di tampone KH_2PO_4 ($0,1\text{ M}$; $\text{pH } 6,8$) contenente il 10% di plasma umano normale, $276\text{ }\mu\text{g}$ di CaCl_2 , $2\text{H}_2\text{O}$, $10\text{ }\mu\text{l}$ di soluzione di troponina I a $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ e $50\text{ }\mu\text{l}$ di soluzione troponina C a $10\text{ }\mu\text{g/ml}$.

E' preferibile attuare queste operazioni in mezzo sterile utilizzando soluzioni di troponina I e di troponina C sterilizzate, per esempio facendo loro attraversare un filtro con pori di 0,22 μ m di diametro.

La soluzione ottenuta di concentrazione di TnI di circa 100 ng/ml e TnC di circa 500 ng/ml è utilizzata in seguito per preparare una gamma di diluizioni da 1 ng/ml a 10 ng/ml di troponina I.

- Si preparano allo stesso modo soluzioni contenenti 1 o 2 o 10 equivalenti molari di troponina C rispetto alla troponina I.

La composizione in polvere potrà essere ottenuta mediante liofilizzazione di una composizione acquosa preparata come in precedenza ma senza plasma umano.

Si preparano in modo analogo soluzioni contenenti da 1 a 10 equivalenti molari di troponina C rispetto alla troponina T, sostituendo la troponina I con la troponina T.

Realizzazione delle prove

Le soluzioni conservate a 4°C sono analizzate in giorni scelti, durante 6 settimane, utilizzando come riferimento una serie campione, preparata estemporaneamente, partendo dalla soluzione di troponina I conservata a -80°C.

La determinazione è attuata con due anticorpi monoclonali diretti contro la troponina I miocardica; il primo anticorpo è adsorbito sulle pareti dei tubi per saggi immunologici messi in commercio da Nunc (USA) sotto il riferimento Maxisorp, Startube;

il secondo anticorpo è marcato con la perossidasi; il metodo è un metodo sandwich.

La preparazione di questi anticorpi è descritta in *Molecular Immunology* 29 (2) 271-278 (1992). Si è constatato che non vi è interferenza in questa determinazione con le altre isoforme di troponina I, la troponina C o le altre proteine miocardiche.

In assenza di TnC, dal primo giorno di conservazione, si osserva una diminuzione sensibile della concentrazione di TnI per tutte le diluizioni; se la TnC è sostituita con actomiosina, o con tropomiosina alla concentrazione di 5 equivalenti molarli rispetto alla TnI, la concentrazione di TnI misurata al termine di 12 giorni è soltanto 2/3 rispetto alla concentrazione di partenza di 10 ng/ml mentre le soluzioni stabilizzate mediante la TnC e CaCl_2 non sono alterate.

Al termine di 40 giorni, le soluzioni di TnI, stabilizzate mediante differenti concentrazioni di TnC e CaCl_2 non sono alterate, mentre le soluzioni non stabilizzate hanno una concentrazione apparente che può cadere sino all'80%.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione stabilizzata di troponina I o T per saggi immunologici, caratterizzata dal fatto che comprende una soluzione acquosa contenente troponina I o troponina T, 1 a 10 equivalenti molari di troponina C per equivalente molare di troponina I o T, e ioni Mg^{++} e/o Ca^{++} .
2. Composizione secondo la rivendicazione 1, caratterizzata dal fatto che contiene una quantità di sali di Mg^{++} e/o Ca^{++} , in particolare di $CaCl_2$, compresa tra 100 e 10000 volte, in peso quella della troponina I o della troponina T.
3. Composizione secondo una delle rivendicazioni 1 e 2, caratterizzata dal fatto che comprende troponina I e da 2 a 5 equivalenti molari di troponina C per equivalente molare di troponina I.
4. Composizione secondo una delle rivendicazioni 1 a 3, caratterizzata dal fatto che il mezzo di dissoluzione è una soluzione acquosa tamponata a pH compreso tra 4 e 10.
5. Composizione secondo la rivendicazione 4, caratterizzata dal fatto che il solvente è costituito sino al 100% di plasma umano.
6. Composizione secondo una delle rivendicazioni 3 a 5, caratterizzata dal fatto che la concentrazione di troponina I è compresa tra 0,01 ng/ml e 1 µg/ml e che la concentrazione di sali di Ca^{++} , in particolare è compresa tra 20 µM e 10 mM.
7. Composizione in polvere per la preparazione di una composizione stabilizzata secondo una delle rivendicazioni precedenti,

caratterizzata dal fatto che contiene troponina I o troponina T, 1 a 10 equivalenti molarì di troponina C per equivalente molarè di troponina I o T ed eventualmente ioni Mg^{++} e/o Ca^{++} .

8. Composizione secondo una delle rivendicazioni precedenti, caratterizzata dal fatto che contiene $CaCl_2$.

9. Composizione secondo la rivendicazione 7, caratterizzata dal fatto che è sotto forma liofilizzata e priva di ioni Mg^{++} e/o Ca^{++} .

10. Procedimento di stabilizzazione di una composizione acquosa di troponina I o T per saggi immunitari, caratterizzato dal fatto che consiste nell'aggiungere da 1 a 10 equivalenti molarì di troponina C per equivalente molarè di troponina I o T, e ioni Mg^{++} e/o Ca^{++} .

11. Procedimento secondo la rivendicazione 10, caratterizzato dal fatto che consiste nell'aggiungere una quantità di sali di Mg^{++} e/o Ca^{++} , in particolare $CaCl_2$, di preferenza equivalente a 100 fino a 10000 volte in peso quella della troponina I o della troponina T.

Ing. Paolo RAMBELLI
N. iscriz. ABO 435
In proprio e per gli altri

hg