



10	ES	11	NUMERO	10	A 1
			52916		
			FECHA DE PRESENTACION		

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO			32 FECHA			33 PAIS		
P 25 48 963.8			3 de noviembre de 1.975			República Federal Alema na		
47 FECHA DE PUBLICIDAD		51 CLASIFICACION INTERNACIONAL			62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA			
		GOIN						
64 TITULO DE LA INVENCION								
PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD DE CREATININASA-MB EN UNA MUESTRA DE UN LIQUIDO CORPORAL.								
71 SOLICITANTE (S)								
MERCK PATENT GESELLSCHAFT MIT BESCHRANKTER HAFTUNG								
DOMICILIO DEL SOLICITANTE								
61 Darmstadt 2, República Federal Alemana								
72 INVENTOR (S)								
Dr. Uwe Würzburg. Dr. Norbert Henrich Dr. Hans-Dieter Orth Dr. Hermann Lang								
73 TITULAR (ES)								
74 REPRESENTANTE								
D. Jaime Gomez-Acebo y Modet								

La invención se refiere a un procedimiento y a un medio para determinar la actividad de la creatinincinasa-MB en los líquidos del cuerpo humano.

5 La determinación de la actividad de creatin-
cinasa (ATP: creatin-fosfotransferasa, E.C. 2.7.3.2; abrevia-
ción: CK) en el suero se considera como el método de laborsto-
rio mas sensible en la diagnosis de las enfermedades en la mus-
culatura del esqueleto y del corazón, especialmente en el in-
farto del miocardio. La diferenciación de traumatismos en la
10 musculatura del esqueleto y del corazon, especialmente en la
diagnosis diferencial del infarto de miocardio, es sin embargo
muy difícil. Por la determinación de la actividad total de la
CK no se puede efectuar con seguridad una diferenciación. Por
esta razón se ha intentado aumentar la fuerza de expresión
15 diferencial-diagnóstica de la determinación de la actividad
de la CK midiendo la actividad de ulteriores enzimas en el
suero y corelacionando entre si los resultados de medición, por
ejemplo, por formación del cociente CK/glutamato-oxalacetato-
transaminasa. Los cocientes de esta clase no permiten, sin embar-
20 go, un empleo en la diferenciación entre infarto del corazón
e infarto del pulmón ó entre infarto del corazón y consecuen-
cias de shock por otras causas.

La CK se presenta en el cuerpo en forma de
tres isoenzimas, esto es CK-MM, por ejemplo, en los músculos,
25 CK-BB, por ejemplo, en el cerebro y como híbrido CK-MB (com-
puesto de una subunidad M y de una subunidad B), por ejemplo,
en el músculo cardiaco. La actividad CK que se presenta en la
sangre (suero) se debe normalmente a la isoenzima CK-MM, ya
que la CK-BB no pasa a través de la barrera licor-sangre y la
30 CK-MB está limitada a determinados órganos (por ejemplo, el mús-
culo cardiaco).

culo cardiaco. En lesiones del músculo cardiaco (por ejemplo, en el infarto cardiaco) se liberará CK-MB sin embargo a la sangre (suero) y se puede demostrar allí.

5 La determinación cuantitativa de esta isoenzima además de la CK-MM en el suero se considera el método de laboratorio mas sensible y desde el punto de vista del diagnóstico diferencial como el más indicador para la demostración del infarto c-ardiaco. Además del músculo cardiaco otros órganos contienen también CK-MB (por ejemplo, pancreas, diafragma, 10 aorta, pulmón y utero) pero la actividad en estos órganos es en un factor de 100 inferior a la del músculo cardiaco de manera que las actividades de CK-MB liberadas eventualmente de los órganos mencionados se encuentran por debajo del límite demostrable.

15 Las determinaciones de la actividad de CK-MB, hasta ahora usuales, se limitaban esencialmente a 3 métodos.

1. Electroforesis sobre distintos soportes. Los resultados así obtenidos son a veces contradictorios; frecuentemente se presentan más bandas que isoenzimas existen (Artefactos).

20 2. Cromatografía en distintos materiales de columna. Este método es muy lento (varias horas de trabajo efectivo) y no es adecuado para investigaciones de rutina. Los resultados de distintas investigaciones son en parte contradictorios.

3. Determinación inmunológica con anticuerpos precipitadores.

25 Este método se ha descrito en las solicitudes de patente alemana P. 21 28 670 y P 22 58 822 y suministra, por ejemplo, en la cuantificación de las isoenzimas de la aldolasa y fosfatasa alcalina buenos resultados. Para la determinación de actividades relativamente reducidas de CK y en especial de

30 CK-MB, sin embargo, la sensibilidad del método no es suficiente.

Todos estos procedimientos exigen, además, para su realización un mayor período de tiempo y por lo tanto no son adecuados para su empleo en la diagnosis rápida de un infarto cardiaco.

5 La invención tenía por lo tanto el cometido de desarrollar un procedimiento sencillo, reproducible y de rápida realización y un medio para la determinación de la actividad de la CK-MB en una muestra de un líquido corporal.

10 Este cometido se soluciona, según la presente invención, debido a que se pone a disposición un procedimiento, hasta ahora no conocido, que trabaja con anticuerpos específicos, que inhiben totalmente la actividad enzimática de las subunidades M en la CK-MM y CK-MB sin inactivar la actividad enzimática de las subunidades B en caso de existir en la CK-MB.

15 Objeto de la invención es, por lo tanto, un procedimiento para la determinación de la actividad de CK-MB en una muestra de un líquido corporal, que se caracteriza porque una muestra se incuba, en caso dado, en presencia de sustratos de CK con anticuerpos que son capaces de inhibir totalmente la actividad de las subunidades M en las CK-isoenzimas MM y MB sin inactivar la actividad enzimática de las subunidades de la CK-MB en caso dado existente, y la actividad de la subunidad B de la CK se determina en forma conocida fotométricamente.

25 Objeto de la invención es, además, un medio para determinar la actividad de CK-MB en una muestra de un líquido corporal, que se caracteriza porque contiene anticuerpos que son capaces de inhibir la actividad enzimática de la subunidad M en las creatincinasas MM y MB sin desactivar la actividad enzimática de la subunidad B de CK-MB en caso dado existente.

30

Una forma de ejecución preferente de este medio se caracteriza porque los anticuerpos allí contenidos son capaces de inhibir totalmente en la muestra a determinar hasta 2500 U/l de la subunidad M en la CK-MM y CK-MB.

5 Objeto de la invención es además el empleo de este medio para la determinación de la actividad de CK-MB junto con CK-MM y en especial como agente auxiliar para la diagnosis del infarto del miocardio y/o otras enfermedades o bien lesiones del músculo cardiaco. Objeto de la invención es, además,
10 el empleo de este medio para la determinación simultánea de la actividad total de la CK y de la actividad de CK-MB en una muestra.

Como líquido corporal es en primer lugar adecuado para el procedimiento de la invención el suero humano.
15 Pero también se puede emplear cualquier otro líquido del cuerpo, tal como sangre, plasma, úrea, esputos y sudor del ser humano, pero también material de investigación análogo de animales para la determinación. La CK-BB perturba la realización del procedimiento de la presente invención y, por lo tanto, no debe estar presente en los líquidos corporales a comprobar.
20

Los anticuerpos necesarios para el procedimiento de la presente invención se obtienen por inoculación de animales con antígenos CK-MM. Como antígenos se emplean preferentemente CK-MM humanos. Pero también es posible emplear CK-MM
25 de animales si los antisueros, así obtenidos, son capaces de inhibir totalmente la actividad enzimática de las subunidad M en la CK-MM ó CK-MB humanas, en caso dado, también en presencia de sustratos CK, sin inactivar la actividad enzimática de la subunidad B en las CK-MB en caso dado existentes. Animales donadores de antígenos CK-MM son, en primer lugar, las mas disti
30

tas clases de monos, preferentemente los monos Rhesus y chimpancés, además, los animales domésticos tales como cerdos, caballos, reses, conejos, cobayas y otros animales tales como ratas, ratones y aves tales como gansos, patos, gallinas.

5 El antígeno de CK-MM empleado para la obtención de los anticuerpos deberá estar libre de las actividades de la CK-MB y CK-BB. Un criterio sensible para esta exigencia de pureza es el análisis inmunológico que, preferentemente, se efectúa mediante técnica de difusión o de electroforesis. Además son útiles, por ejemplo, los métodos de disk-electroforesis analítica y de la electrofocación de poliacrilamida-gel. Al emplear estos métodos tiene preferencia la demostración de la pureza con respecto a la CK-MB y CK-BB. Por el contrario es menos importante la pureza absoluta con respecto a otras proteínas que se puedan determinar según estos métodos mencionados en último lugar. La microheterogeneidad de los tipos de CK-isoenzimas, que se puede expresar por ejemplo, en ligeras diferencias de la composición del aminoácido de las distintas isoenzimas, no tiene como criterio de pureza por regla general papel alguno.

10

15

20

Para la inmunización se utilicen aquellos animales que después de infectados con CK-MM activada formen anticuerpos que inhiban totalmente la actividad enzimática de la subunidad M en las creatincinasas MM y MB, sin inactivar la actividad enzimática de la subunidad B de la CK-MB en caso dado existente. Preferentemente son adecuadas para ello las cabras. Pero también entran en consideración otros animales, especialmente los animales vertebrados, como donadores de anticuerpos, por ejemplo, clases de monos, caballo, res y animales similares a las reses, oveja, perro, cerdo, conejo, aves tales

25

30

5 como gallinas, pavos, gansos y patos, además, ratas, ratones y cobayas. Las cabras se emplean especialmente para la inducción de aquellos anticuerpos que también en presencia de sustratos de CK son capaces de ejercer inhibiciones totales de la subunidad M en la CK-MM y CK-MB.

La inmunización de los animales de ensayo se efectúa según la invención con CK-MM humana o animal activada. La activación de la CK-MM se puede efectuar mediante reactivos estabilizadores y activadores de los grupos SH conocidos y/o por iones de metal divalentes, preferentemente mediante una combinación de los reactivos mencionados y de los iones de metal. Como reactivos estabilizadores y activadores de los grupos SH se emplean preferentemente, por ejemplo, N-acetilcisteína, mercaptoetanol y ditioneína, además, glutathione, cisteína, ditioneína, hidrobromuro de bromuro de S-(2-aminoetil)-isotiouonium (AET) y/o ácido tioglicólico. Los iones de metal divalentes provienen de correspondientes sales hidrosolubles (por ejemplo, de los cloruros o acetatos) preferentemente del magnesio, además, del manganeso, calcio y/o cobalto. Tales activaciones son fundamentalmente conocidas en otros terrenos y usuales al especialista.

La ulterior realización de la inmunización y la elaboración para la obtención de los antisueros o bien anticuerpos se efectúa en forma conocida. También la elaboración y el almacenamiento de los antisueros o bien anticuerpos se efectúa según métodos conocidos en la inmunología.

Los anticuerpos a emplear para el procedimiento de la presente invención se adjudican preferentemente a la clase de la IgG-immunoglobulina (anticuerpos bivalentes). Su peso molecular se encuentra entre unos 130000 y 210000, preferen-

temente en unos 160000; su constante de sedimentación aproximada se encuentra entre 6 S y 8 S, preferentemente en unos 7 S; su proporción en hidrato de carbono asciende a aproximadamente un 3 % de su peso total. Además de los anticuerpos JgG se pueden emplear también fragmentos JgG ($=F_{ab}$) y anticuerpos JgM monovalentes según la presente invención.

Los anticuerpos empleados según la presente invención deben inhibir totalmente la actividad enzimática de las subunidades M de la creatincinasa. Bajo "inhibición total" se entiende aquí una inhibición en la que en promedio se mantienen como máximo 5 U/l, preferentemente menos de 3 U/l de la actividad enzimática de la subunidad M en la CK-MM y CK-MB en una muestra.

Los anticuerpos no deben influenciar además la actividad enzimática de la subunidad B en la CK-MB. Bajo esto se ha de entender aquí que como máximo se inhiben en una muestra 10 U/l, preferentemente menos de 5 U/l de actividad enzimática de la subunidad B de la CK-MB.

Para realizar una forma de ejecución preferente del procedimiento de la presente invención, que consiste en que la muestra del líquido corporal a determinar y los anticuerpos se incuban en presencia de sustratos CK, deberán tener los anticuerpos además la propiedad de poder desarrollar su efecto inhibitor con respecto a la actividad enzimática de la subunidad M en la CK-MM y CK-MB también en presencia de sustratos CK en forma completa sin influenciar la actividad enzimática de la subunidad B en la CK-MB en caso dado existente. Esta propiedad está dada adicionalmente a las propiedades arriba señaladas, por ejemplo, en los anticuerpos que se obtienen de cabras por inmunización con CK-MM totalmente activada.

Esta no es imprescindible para la realización normal del procedimiento de la presente invención (primeramente incubación con los anticuerpos, después adición de los sustratos CK y medición fotométrica).

5 Como sustratos CK se pueden emplear todos los sustratos o bien efectores usualmente empleados. En relación con lo presente son de importancia, en primer lugar, la creatina, el fosfato de creatina, el difosfato de adenosina, el trifosfato de adenosina y los iones de magnesio.

10 La determinación de la actividad, o bien de la reactividad de la CK y de sus isoenzimas se puede realizar en principio según todos los procedimientos que trabajen con rapidez y precisión. Son adecuados, por ejemplo, los procedimientos conocidos que permiten medir la actividad de la CK
15 después de la adición de sustratos de CK mediante una determinación fotométrica a continuación de reacciones auxiliares. Para ello se pueden emplear métodos colorimétricos, tal y como se describen, por ejemplo, en "Methoden der enzymatischen
20 Amalyse", editado por H.U. Bergmeyer, 3ª edición (1974), tomo 1, pág. 145 y s. Tienen preferencia, sin embargo, los métodos cinéticos en los cuales la actividad enzimática se determina por medición en UV a, por ejemplo, 334, 340 ó 366 nm. Se emplea especialmente, por ejemplo, un método standard según el cual la
25 CK se determina empleando fosfato de creatina y difosfato de adenosina (Z.Klin. Chem. Klin. Biochem., Tomo 8, pág. 658 y s. (1970) y tomo 10, pág. 182 (1972). En el mercado se encuentran envases de ensayo para determinar la actividad CK según este método.

30 Según otro procedimiento de determinación conocido se puede determinar el CK también fluorométricamente.

Por la CK se puede liberar de fosfato creatínico la creatina que se puede medir fluorométricamente según el método elaborado por R.B. Conn (Clin.Chem., tomo 6, página 537 y s. (1960)) por reacción con ninhidrina en solución fuertemente alcalina (véase Sax et al, Clin. Chem., tomo 11, página 951 y s. (1965)).

Una realización típica del procedimiento de la presente invención se explica a continuación:

La muestra del líquido corporal a determinar, preferentemente una muestra de suero humano, se mezcla con una cantidad de anticuerpos CK-MM que es suficiente para inhibir hasta 2500 U/l de la subunidad M en la CK-MM y CK-MB, preferentemente unas 1000 U/l. En los líquidos corporales con mayores actividades de CK totales se efectúa, convenientemente antes de la determinación propiamente dicho, una diluición previa a unas 1000 U/l. Esta diluición previa se ha de considerar en el cálculo. Se mezcla y se incuba durante unos 1 a 30, preferentemente unos 5 minutos, a temperaturas entre +10 y +40°C, preferentemente aproximadamente a temperatura ambiente, especialmente a 25 ó 30°C. Después se determina la restante actividad enzimática de la mezcla de reacción con ayuda de un procedimiento conocido, preferentemente con el método UV arriba descrito. La mezcla suero-anticuerpos se agrega a una mezcla de sustrato-enzima-coenzima conocida, que contiene todos las enzimas, coenzimas y sustratos necesarios para la realización del método, y a continuación se agrega una cantidad suficiente de una solución tampón (pH hasta aproximadamente 7). Preparados comerciales usuales contienen, por ejemplo, como mezcla de enzima/coenzima, hexocinasa, glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa, difosfato adenosínico y nicotinamida-adenina-dinucleotíd-

fosfato y como sustratos creatinfosfato y glucosa.

También es posible agregar la mezcla de suero-anticuerpos a una mezcla de coenzima y enzima (o a la inversa) y a continuación agregar una mezcla de tampón-sustrato. Como
5 tampones son adecuados para la reacción los tampones neutros, tal como, preferentemente, por ejemplo tampón de trietanolamina ó acetato imidazólico, además, entre otros, tampón de ácido morfolinopropansulfónico y morfolinoetansulfónico. Se mezcla, se incuba unos 1 a 10, preferentemente 5 minutos, a 15 - 40,
10 preferentemente a 25 ó 30°C y después se determina, aproximadamente a temperatura ambiente, la variación de la extinción. De esto se calcula a continuación la actividad de la subunidad B en la CK-MB.

En una forma de ejecución preferente se puede
15 modificar este procedimiento en el sentido de que la muestra del líquido corporal a analizar se incuba con los anticuerpos y los sustratos de CK en presencia de un tampón junto con las sustancias necesarias para la reacción de demostración (sin la previa incubación de la muestra con los anticuerpos). Para esta
20 forma de realización es condición previa una ulterior propiedad de los anticuerpos: estos deben inhibir la actividad enzimática de la subunidad M de la CK-MM y CK-MB también en presencia de sustratos de CK en forma total. Esta propiedad la poseen por ejemplo, los anticuerpos que mediante CK-MM totalmente activada se obtiene de las cabras. Esto permite realizar el procedimiento de la presente invención en forma sencilla y más rápida:
25

Así se pueden, por ejemplo, disolver los anticuerpos, que previamente se llevaron con la mezcla de coenzima-enzima-sustrato empleada para la reacción de demostración, co-
30

nocida, a una forma liofilizada, en una cantidad determinada de una solución de tampón, agregar el líquido corporal a determinar (por ejemplo, suero) y efectuar la determinación de la actividad de la proporción B de la CK-MB. En una variante de este procedimiento se pueden incorporar los anticuerpos también con una mezcla, compuesta solamente de coenzimas y enzimas, en el liofilizado y agregar los sustratos de la solución tampón.

Según otra forma de ejecución preferente se puede realizar una determinación simultánea de la actividad total de la CK y de la actividad de la CK-MB con ayuda del procedimiento preferente, acabado de mencionar, según la invención en una sola vez. Se puede proceder, por ejemplo, determinando primeramente la actividad total de la CK de la muestra según un procedimiento fotométrico conocido; a continuación agregando al preparado un liofilizado disuelto en agua, compuesto de anticuerpos de CK-MM. Se incuba entonces durante uno a 10, preferentemente 5 minutos y fotométricamente se determina la reactividad de la muestra. También para esta forma de ejecución es condición previa que los anticuerpos contra la CK-MM sean capaces de inhibir totalmente la actividad enzimática de la subunidad M de la CK-MM y CK-MB, también en presencia de sustratos de CK.

La capacidad anticuerpos de los antisueros se puede graduar en estas formas de ejecución preferentes del procedimiento de la presente invención de manera que sea capaz de inhibir totalmente hasta 2500 U/l, preferentemente unas 1000 U/l de la subunidad M en la CK-MM y CK-MB. En caso de que las actividades de CK de la muestra a determinar sean demasiado altas para esta capacidad de inhibición de los anticuerpos, se de erán realizar también aquí diluciones previas, por ejemplo,

a actividades de la subunidad M en la CK-MM y CK-MB de aproximadamente 1000 U/l.

El procedimiento de la presente invención tiene considerables ventajas sobre el estado de la técnica. Entre estas se encuentra la alta precisión de los resultados y la rapidez así como la sencillez de la realización.

La precisión del procedimiento de la invención se basa en que los anticuerpos empleados responden específicamente a la subunidad M de la CK-MM y CK-MB y que por lo tanto permiten determinar en una determinación directa la actividad de la CK-MB en los líquidos corporales, tal como el suero humano.

En comparación, el procedimiento inmunológico para la determinación cuantitativa de isoenzimas, descrito en las solicitudes de patente alemanas P 21 28 670 y 22 58 822, tiene desventajas. Según este procedimiento se precipitan las isoenzimas de la CK por anticuerpos precipitadores específicos a las isoenzimas y determina en cada caso la reactividad restante que queda en los sobrenadante de la precipitación inmunizada. Independientemente del gasto de este método, que por regla general hace necesaria la preparación de varios antisueros específicos, se han de realizar en todos los casos dos preparaciones de ensayo distintos, esto es, la determinación de la actividad total de la CK y la determinación de la actividad residual de la CK después de la precipitación. La actividad de la CK-MB por lo tanto solo se puede determinar mediante una medición de las diferencias. El resultado va por lo tanto, conforme a las reglas del cálculo erróneo, recargado de la inseguridad en ambas mediciones. Según el método de la presente invención se evita la adición de errores y se realiza una medición

directa.

Una desventaja del procedimiento de precipitación es también que la precipitación del inmunizado, como reacción secundaria, precisa de relativamente mucho tiempo (desde unos 60 minutos hasta varias horas), por lo que el procedimiento no es adecuado como ensayo rápido.

En Clin. Chim. Acta, tomo 58, páginas 223 - 232 (1975) se describen ya también anticuerpos inhibidores contra las CK-isoenzimas. Estos anticuerpos producen además de una inhibición del 100 % de la CK-MM también una inhibición el 80 % de la CK-MB. Mas allá de la subunidad M de la CK-MB se inhibe por lo tanto una proporción esencial de la sub-unidad B de los anticuerpos empleados (Las actividades de la subunidad M y B en en la CK-MB se comportan con respecto a la actividad total de esta isoenzima en cada caso como 50 : 100). También si la reactividad hallada con estos anticuerpos de aproximadamente un 20 % fuese reproducible, los valores obtenidos se encontrarían, sin embargo, demasiado bajos para una medición precisa de la CK-MB, para ser aún recogible con seguridad, ya que la actividad total de CK en el suero es de por sí ya reducida. Los anticuerpos inhibidores descritos en esta literatura no se emplearon por lo tanto tampoco para la determinación de las isoenzimas CK según el principio de inhibición. Según el procedimiento de la invención queda por el contrario aún aproximadamente un 50 % de la actividad CK-MB, es decir, aproximadamente la totalidad de la actividad de la subunidad M disponible para la medición. Esto significa un progreso considerable.

La rápida realización es una ventaja especial del procedimiento de la invención. Esto vale especialmente para la forma de realización preferente según la cual la inhibi-

ción de la parte M de la CK-MM y CK-MB, así como la determinación de la actividad residual se efectúan simultáneamente. Según esta forma de ejecución se dispone en un plazo de tiempo muy breve, por ejemplo, dentro de un plazo de 5 a 30 minutos, preferentemente entre 5 y 15 minutos, de un resultado del ensayo exacto para establecer un diagnóstico.

Una ventaja digna de consideración del procedimiento de la invención es también su sencilla realización. El método de ensayo se puede realizar en grandes institutos o bien clínicas (por ejemplo, con ayuda de los aparatos mecanizados usuales para la determinación de las actividades enzimáticas), pero también se puede realizar en institutos más pequeños o bien en el laboratorio médico con ayuda de un fotómetro.

Para determinaciones individuales son adecuados envases de ensayo que contienen todos los reactivos necesarios para la realización del procedimiento de la presente invención, así, por ejemplo, una mezcla usual de coenzima, enzima y sustrato, los anticuerpos CK-MM de la presente invención y una solución tampón. Un envase de ensayo de ésta o clase similar permite la determinación de la CK-MB con el menor gasto posible.

Según el estado de la técnica no era de esperar que el problema de la determinación de la CK-MB se pudiera resolver mediante un procedimiento tan sencillo y tan rápido como el de la presente invención. Así no era de esperar que se pudieran preparar antisueros específicos que, si bien inhiben totalmente la actividad enzimática de la subunidad M en la CK-MM y CK-MB, sin embargo, no influyen la actividad enzimática de la subunidad B de la CK-MB. El empleo de anticuer-

pos con estas propiedades hasta ahora no conocidas hace posible la reacción según la presente invención.

También es sorprendente que los anticuerpos empleados según la presente invención mantengan su total fuerza inhibidora también en presencia de sustratos. Esto no es evidente. Así se describen en la literatura (Ann. N.Y.Acad. Sci., tomo 103, páginas 858 - 889 (1963)) anticuerpos que en presencia de sustratos CK ya no inactivan la CK-MM en un 100 %. Los anticuerpos con tales características serían totalmente inservibles para las formas de realización preferentes del procedimiento de la presente invención, según las cuales la inhibición de los anticuerpos y la adición de los sustratos de CK se efectúan simultáneamente. Las proporciones de las actividades de M no inhibidas aumentarían erróneamente el valor de medición de la CK-MB, eventualmente simular actividades de CK-MB no existentes y de esta manera dar datos de laboratorio falsos para la diagnosis.

La sorprendente propiedad de los anticuerpos empleados según la presente invención de inhibir totalmente la actividad enzimática de la subunidad M de la CK-MM y CK-MB sin influenciar la actividad enzimática de la subunidad B de la CK-MB, y al mismo tiempo desarrollar en presencia de sustratos su total fuerza inhibidora con respecto a la subunidad M en la CK-MM y CK-MB, permiten una rapidez y precisión en la determinación de la actividad de la CK-MB hasta ahora inalcanzable con métodos inmunológicos. Se le abre así a la práctica una vía para determinar la actividad de la CK-MB mediante un ensayo rápido.

Se hace posible diferenciar el hallazgo del laboratorio de un aumento de la actividad de la CK en el paciente

te en el sentido de si está presente una enfermedad o bien traumatización de la musculatura del esqueleto o de la musculatura cardiaca. De esta manera se obtienen importantes datos adicionales para la diagnósis diferencial del infarto cardiaco (por ejemplo, del infarto pulmonar y/o de consecuencias de shock) y de otras enfermedades o bien lesiones del corazón.

Además, se obtienen mediante la determinación específica y exacta de la actividad de la CK-MB indicaciones sobre la participación o bien lesiones del músculo cardiaco en otros procesos de enfermedad extracardiales (por ejemplo, en casos de envenenamiento o accidentes), en operaciones terapéuticas (por ejemplo, en la reavivación) ó en operaciones diagnósticas (por ejemplo, en cateterizaciones cardiacas o angiografías coronarias).

En los ejemplos a continuación significan "M" (ó bien "mM") las concentraciones en moles (o bien milimoles) por litro.

Ejemplo 1

Inhibición de CK-MM, CK-MB y CK-BB por anti-human-CK-MM

A un suero humano inactivado con respecto a su autoactividad de la CK se le agregan CK-MM, CK-MB y CK-BB puras y se determinan las actividades CK de las distintas muestras. A continuación se mezclan 0,1 cc de muestra con 0,1 cc de solución anti-CK-MM (obtenida según el ejemplo Ba)), se mezcla y se incuba durante 5 minutos a 25°C. Después se efectúa una determinación de la reactividad residual de la CK en forma conocida. Los resultados se indican en la tabla a continuación:

Actividades residuales de las isoenzimas CK después de la incubación con anti-human-CK-MM inhibidora
(valores medios \pm l s de en cada caso 5 determinaciones)
(s = variación standard)

5 T a b l a

Isoenzima	Actividad de las isoenzimas agregadas (U/l)	Actividad residual después de incubar con anti-CK-MM (U/l)
CK-MM	98 \pm 1,9	0,3 \pm 2,1
	1043 \pm 22	0,5 \pm 2,5
CK-MB	103 \pm 2,0	53 \pm 1,7
	410 \pm 7,8	206 \pm 6,2
CK-BB	197 \pm 3,8	199 \pm 4,1

15 Dentro de la exactitud de medición se inhiben las actividades de la CK-MM en un 100 %, de la CK-BB en un 0 % y de la CK-MB (correspondiente a la proporción de un 50 % de subunidades B) en un 50 %. Los resultados son constantes en un amplio margen de actividad de las actividades de las isoenzimas agregadas.

20 Ejemplo 2

Ensayo I para la determinación cuantitativa de la actividad de la CK-MB en los líquidos corporales.

a) Composición del envase de ensayo

25 El envase de ensayo es suficiente para 10 determinaciones de actividad. El envase contiene una botella de tampón para 10 determinaciones, 10 botellas de mezcla de coenzima, enzima-sustrato y 1 botella de anti-CK-MM, obtenido según

el ejemplo Ba).

La botella de mezcla coenzima-enzima-sustrato contiene:

	Sal disódica de creatinfosfato, hexahidrato	27,24 mg
	Glutathione reducida	6,4 mg
5	(6 N-acetil-cisteina)	3,4 mg)
	Sal disódica de adenosindifosfato, hexahidrato	1,25 mg
	Sal disódica de nicotinamida-adenina- dinucleotido-fosfato	1,7 mg
	Monofosfato de adenosina, sal disódica	8,47 mg
10	Hexocinasa	5 U
	Glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa	3 U
	Glucosa	8,32 mg
	Acetato de magnesio	4,52 mg

La botella de solución tampón contiene:

15	Acetato de trietanolamina (en agua)	105 mM
----	-------------------------------------	--------

Los anticuerpos liofilizados se disuelven en 2 cc de agua destilada. La solución de anticuerpos formada se ajusta de manera que en total se inhiben hasta 1000 U/l de creatinasa-MM. En sueros con actividades totales de creatina extremadamente altas se ha de diluir el suero por lo tanto previamente a unas 1000 U/l. La solución de anticuerpos se puede almacenar a $+4^{\circ}\text{C}$ como mínimo durante 7 días.

b) Realización de la determinación de la actividad de la CK-MB

bl) Realización

25 En un recipiente de reacción de pipetan:

0,1 cc de suero

+ 0,1 cc de solución de anticuerpos

se mezcla bien, se incuba durante 5 minutos a 25° .

Después se vierten 0,1 cc de esta mezcla de reacción así como 2,0 cc de solución tampón en una botella con la mezcla de coenzima, enzima y sustrato.

Se mezcla, se incuba durante 5 minutos a 25°C, después se vierte en una cubeta, se mide la extinción a 25°C y a continuación se determina la variación de la extinción por minuto. Longitud de onda: 334, 340 ó 366 nm; espesor de capa: 1 cm.

b2) Cálculo

La actividad CK de la muestra determinada se ha de multiplicar

a) con el factor de diluición 2 y

b) con el factor del híbrido CK-MB 2

(en el ensayo se miden solamente las subunidades B de la CK-MB).

De las diferencias de extinción por minuto ($\Delta E/\text{minuto}$) se forma el valor medio y se inserta en la correspondiente fórmula de cálculo:

Medición a 334 nm: Actividad de volumen CK-MB =
 $\Delta E/\text{minuto} \times 4 \times 3500 \text{ U/l}$

Medición a 340 nm: Actividad de volumen CK-MB =
 $\Delta E/\text{minuto} \times 4 \times 3376 \text{ U/l}$

Medición a 366 nm: Actividad de volumen CK-MB =
 $\Delta E/\text{minuto} \times 4 \times 6364 \text{ U/l}$

Ejemplo 3

Ensayo II para la determinación cuantitativa de la actividad de la CK-MB en los líquidos corporales.

a) Composición del envase de ensayo

El envase de ensayo es suficiente para 30 determinaciones de actividad. El envase contiene 1 botella de solución tampón para 30 determinaciones y 30 botellas de una mezcla liofilizada compuesta de coenzima, enzima, sustrato y anti-CK-MM según el ejemplo Ba).

La cantidad de acetato de trietanolamina contenida en la botella de solución de tampón corresponde a la cantidad indicada en el ejemplo 2 a). Las distintas botellas con la mezcla de coenzima, enzima, sustrato y anti-CK-MM según el ejemplo Ba) corresponden respectivo a los tres componentes mencionados en primer lugar, asimismo a la composición indicada en el ejemplo 2 a) y contienen adicionalmente anti-CK-MM que inhibe en total hasta 1000 U/l de CK-MM.

b) Determinación de la actividad de la CK-MB

b1) Realización

Al contenido de una botella de mezcla de coenzima/enzima/sustrato/anti-CK-MM se pipetan 2,0 cc de solución tampón y 0,1 cc de suero. Se mezcla, se incuba durante 5 minutos a 25°C, después se vierte en una cubeta y durante 5 minutos se miden las extinciones a 25°C. Longitud de onda: 334, 340 ó 366 nm; espesor de capa: 1 cm

b2) Cálculo

De las diferencias de extinción por minuto ($\Delta E/\text{minuto}$) se forma el valor medio y se inserta en la correspondiente fórmula de cálculo:

Medición a 334 nm: Actividad de volumen CK-MB =

$$\Delta E/\text{minuto} \times 7000 \text{ U/l}$$

Medición a 340 nm: Actividad de volumen CK-MB =

$$\Delta E/\text{minuto} \times 6752 \text{ U/l}$$

Medición a 366 nm: Actividad de volumen CK-MB =

$$\Delta E/\text{minuto} \times 12728 \text{ U/l}$$

5 Ejemplo 4

Determinación simultánea de la actividad total CK y de la actividad CK-MB

a) Composición del envase de ensayo

10 La composición del envase de ensayo corresponde a la del ejemplo 2 a).

b) Determinación de la actividad total CK y de la actividad CK-MB de la CK-MB

b1) Realización

15 En la botella de mezcla coenzima-enzima-sustrato se pipetan 2,0 cc de solución tampón y 0,1 cc de suero o bien de dilución de suero. De mezcla, se incuba durante 5 minutos a 25°C, después se vierte en una cubeta y durante 20 2 minutos se determina la variación de la extinción (ΔE_1) a 25°C. A continuación se agregan 0,1 cc de solución anticuerpo, se mezcla inmediatamente y después de 3 minutos se vuelve a determinar la variación de la extinción (ΔE_2) a 25°C. Longitud de onda: 334, 340 ó 366 nm; espesor de capa: 1 cm.

b2) Cálculo

25 La actividad total de la CK se calcula como sigue:

Medición a 334 nm: Actividad de volumen CK en total =

$$\Delta E_1/\text{minuto} \times 3500 \text{ U/l}$$

Medición a 340 nm: Actividad de volumen CK-total =
 $\Delta E_1/\text{minuto} \times 3376 \text{ U/l}$

Medición a 366 nm: Actividad de volumen CK-total =
 $\Delta E_1/\text{minuto} \times 6364 \text{ U/l}$

5 La actividad CK-MB se obtiene según las siguientes fórmulas de cálculo:

Medición a 334 nm: Actividad de volumen CK-MB =
 $\Delta E_2/\text{minuto} \times 7350 \text{ U/l}$

10 Medición a 340 nm: Actividad de volumen CK-MB =
 $\Delta E_2/\text{minuto} \times 7090 \text{ U/l}$

Medición a 366 nm: Actividad de volumen CK-MB =
 $\Delta E_2/\text{minuto} \times 13364 \text{ U/l}$

Ejemplo 5

15 Determinación de las actividades de la CK-MB en pacientes con y sin infarto cardiaco con el envase de ensayo según el ejemplo 3

a) Actividades CK de distintos colectivos de pacientes

	Número de casos	Valores medios	
		CK-total (U/l)	CK-MB (U/l)
Pacientes con actividades CK elevadas sin infartos cardiacos	48	480	<1,7
25 Pacientes con infartos cardiacos	5	510	44

La tabla indica que con ayuda del método de determinación según la presente invención se puede obtener rápida y claramente una indicación sobre un infarto cardiaco.

b) Desarrollo de las actividades CK-MB en un paciente con infarto cardiaco

	Horas después de la iniciación del infarto	CK/MB (U/l)
5	3,5	< 5
	4,5	< 5
	5,5	6
	7,5	22
10	8,5	23
	9,5	29
	10,5	50
	11,5	46
	13,5	56
	15,5	55
	17,5	64
15	21,5	62
	25,5	50
	29,5	42
	33,5	25
	43,5	18
	53,5	< 5
20	61,5	< 5

Los valores numerales indican el aumento y la caída de nuevo de la actividad de la CK-MB en un paciente de infarto cardiaco determinada con el procedimiento de la presente invención.

Preparación de los productos de partida

Ejemplo A

Obtención de la CK-MM

a) 1,2 kg de músculo de esqueleto humano, congelado, se descon-

gela a temperatura ambiente y se desmenuza mecánicamente. El tejido se suspende en 2,5 litros de tampón 0,05 M de tris/HCl del pH 8,0 [Tampón de tris-(hidroximetil)-aminometan-HCl], que contiene 0,01 M de KCl, 1 mM de EDTA [ácido etilendiamintetraacético] y 1 mM de ditioeritrita, y se homogeniza con un mezclador. El homogenado se agita bajo enfriamiento con hielo durante 45 minutos y a continuación se centrifuga durante 60 minutos a 12000 g. Lo sobrenadante claro (2,680 l) se someta a una fraccionación de sulfato amónico a un pH de 8,0 a los límites de un 40 - 75 % de saturación. El precipitado 0,75 s se recoge en 0,04 M de tampón tris/HCl y se dializa contra el mismo tampón. Para la absorción de la mioglobina y las proteínas de la estre ácidas se agregan 500 g de intercambiador de iones básico húmedo a base de un dextrano reticulado, equilibrado con respecto al mismo tampón. Después de 30 minutos se separa el intercambiador por succión y se lava dos veces, cada una con 400 cc de 0,04 M de tampón tris/HCl del pH 8,0 conteniendo 0,02 M de NaCl. El filtrado y el agua de lavado se reúnen y con sulfato amónico se lleva a 0,75 s. El precipitado se separa por centrifugación, se disuelve en 100 cc de 0,04 M de tampón tris/HCl, del pH 8,0 y se dializa contra el mismo tampón, hasta que ya no se pueda demostrar ningún sulfato amónico más. El dializado claro se equilibra en una columna con un intercambiador de iones básico a base de un dextrano reticulado (6 x 60 cm) con el mismo tampón. La columna se lava con tampón de partida hasta que el eluido esté libre de proteínas. Después se eluye de la columna la enzima con tampón 0,04 M de tris-HCl del pH 8,0, conteniendo 0,02 M de NaCl, 1 mM de EDTA y 1 mM de ditioeritrita. Se reúnen las fracciones con un contenido en enzimas de como mínimo 20 U/cc, se satura con sulfato amónico

a un 80 % y la enzima precipitada se separa por centrifugación. Para la purificación final se somete nuevamente a una cromatografía en el mismo sistema, pero empleando un volumen de columna más pequeño. De las fracciones activas reunidas se precipita la enzima con 0,8 s de sulfato amónico, se disuelve concentradamente en 50 cc de tampón 0,04 M de tris/HCl del pH 8,0 conteniendo 0,02 M de NaCl, 1 mM de EDTA y 1 mM de ditioeritrita, se filtra en forma esteril y nuevamente se lleva con sulfato amónico a 0,8 s. Se obtiene así una suspensión de enzima estable a 4°C de CK-MM con una actividad específica de 25 - 30 U/mg, medido en creatina como sustrato a 25°C.

Volumen: 86 cc; actividad: 316 U/cc; proteina: 11,8 mg/cc.
Rendimiento: unos 30 % (referido al extracto de órgano).

b) Análogo al ejemplo Aa) se aisla CK-MM de tejido muscular de los siguientes animales: mono Rhesus, cerdo, res.

Ejemplo B

Obtención de Anti-CK-MM.

a) CK-MM de músculo humano se dializa contra una solución de NaCl fisiológica, tamponada con 0,07 M de trietanolamina, que contiene 10 mM de mercaptoetanol y 10 mM de MgCl₂. La solución enzimática se libera por ultracentrifugación de los agregados y el contenido en proteínas se ajusta con el tampón de diálisis mencionado a 2 mg/cc. En 1 cc de esta solución se emulsiona 1 cc de Adjuvans de Freund completo (sus ensión de agua-acéite mineral que adicionalmente contiene 2 mg de bacilos de M-tuberculosis matados). Esta emulsión se inyecta intramuscularmente a una cabra. Después de 3 inyecciones de igual clase en un espacio de 3 semanas y otras tres inyecciones de boosterina en cada caso en un espacio de 16 semanas se toma del animal san

gre después de 21 días de la última inyección. El suero obtenido según métodos conocidos se ajusta con una mezcla, conteniendo un 3 % de albumina de suero de oveja y 0,1 % de azida sódica en un tampón de 0,1 M de borato a un pH de 8,4 y se filtra en forma esteril. La solución obtenida, conteniendo anti-musculo humado-CK-MM se llena en porciones de 0,5 cc en botellas de vidrio marrón y se seca por congelación. Los anticuerpos tienen un peso molecular de unos 160 000 hasta 180 000.

b) La CK-MM de musculo humano obtenida según el ejemplo 1a) se dializa contra una solución de NaCl fisiológica, tamponada con 0,1 M de imidazol, pH 6,8, que contiene 7,5 mM de N-acetilcisteina y 25 mM de acetato de magnesio. A continuación se libera la solución enzimática por ultracentrifugación de los agregados y con tampón de dialisis se ajusta en contenido en proteina a 0,2 mg/cc. 1 cc de esta solución se emulsiona con 1 cc de adjuvans de Freund completo. Esta emulsión se inyecta intradermal a un carnero. Después de 3 y 6 semanas siguen 2 inyecciones intramusculares y 3 otras inyecciones de boosterina, cada vez en el transcurso de 14 semanas. 19 días después de la última inyección se toma sangre. La elaboración se efectua como en el ejemplo Ba). Se obtiene anti-musculo humano-CK-MM en forma secada por congelación. Peso molecular de los anticuerpos unos 160000 hasta 180000.

c) CK-MM de músculo de mono de Rhesus se dializa a fondo contra una solución de NaCl fisiologica, tamponada con 0,15 M de imidazol, pH 6,8, que contiene 25 mM de ditioeritrita y 15 mM de cloruro de manganeso(II). Después de retirar los agregados por ultracentrifugación se ajusta el contenido en proteina con

tampón de dialisis a 5 mg/cc. 1 cc de esta solución se emulsiona con 1 cc de adjuvans de Freund completo. Las inyecciones, toma de sangre y elaboración se efectúan análogo al ejemplo Ba). Se obtiene anto-músculo de mono de Rhesus-CK-MM en estado secada por congelación. Constante de sedimentación de los anticuerpos unos 7 s.

d) CK-MM de músculo de cerdo se activa análogo al ejemplo Bb) y la emulsión de antígeno se inyecta con adjuvans de Freund completa a conejos. Después de tres semanas se efectúa una ulterior inyección de antígeno. La inyección se repita después de otras 3 semanas, 19 días después se toma la sangre. La elaboración se efectúa análogo al ejemplo Ba). Se obtiene anti-musculo de cerdo-CK-MM en forma secada por congelación. El peso molecular de los anticuerpos es de unos 160000 hasta 180000.

En forma totalmente análoga se obtiene de músculos de res anti-musculo de res-CK-MM (peso molecular unos 160000 hasta 180000).

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.

Reivindicaciones

1. Procedimiento para determinar la actividad de creatincinasa MB en una muestra de un líquido corporal, caracterizado porque la muestra se incuba con anticuerpos que son capaces de inhibir totalmente la actividad enzimática de la subunidad M en las creatincinasas-isoenzimas-MM y -MB sin inactivar la actividad enzimática de la subunidad B en la creatincinasa-MB en caso dado existente, y la actividad de la creatincinasa-subunidad-B se determina fotométricamente en forma conocida.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra del líquido corporal y los anticuerpos se incuban en presencia de sustratos de creatincinasa.
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque antes de la incubación de la muestra con los anticuerpos en la misma muestra se determina adicionalmente la actividad total de la CK.
4. Procedimiento para determinar la actividad de creatincinasa MB en una muestra de un líquido corporal, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.
- Esta Memoria consta de 29 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 13 OCT 1977

MERCK PATENT GESELLSCHAFT MIT
BESCHRÄNKTER HAFTUNG.J. M. GÓMEZ AGUDO y otros
por el Firmador