



ESPAÑA

19 ES	11 NOMBRE <b>488774</b>	10 A1
	21	
	22 FECHA DE PRESENTACION	

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

### PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
P 29 08 053.3	2 Marzo 1979	Alemania
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	G01N 33/16, G01N 31/14	
64 TITULO DE LA INVENCION		
"Procedimiento para la determinación de la creatinquinasa MB"		
71 SOLICITANTE (ES)		
BOEHRINGER MANNHEIM GMBH.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
Sandhofer Strasse 112-132, D-6800 Mannheim-Waldhof (Alemania)		
72 INVENTOR (ES)		
Dr. Wolfgang Gruber, Dr. Helmut Lenz, Dr. Siegfried Löoser, Dr. Hans-Ralf Linke.		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
Carlos Fernández Candelas		

El invento concierne a un procedimiento para la determinación de la actividad de creatinfosfoquinasa MB, en lo que sigue denominada CK-MB, en el suero.

En el cuerpo humano se presentan dos tipos diferentes de subunidades de esta enzima, a saber las subunidades M y B. Puesto que la enzima activa está compuesta en cada caso por dos subunidades y puesto que las dos subunidades pueden combinarse libremente entre sí, son posibles tres tipos de enzimas: el tipo muscular CK-MM, el tipo cerebral CK-BB y el tipo híbrido CK-MB, que se presenta principalmente en el miocardio, sale en el suero en el caso de un infarto cardíaco y entonces puede encontrarse allí en concentración elevada. La actividad de esta isoenzima híbrida - junto con la actividad global de la CK en el suero puede ser aprovechada para la diagnosis del infarto cardíaco.

Es sabido, por adición de anticuerpos específicos contra la subunidad M de la CK, excluir el tipo muscular de la isoenzima CK-MM que se presenta en el suero y entonces, según uno de los métodos conocidos de la determinación de CK medir la enzima híbrida CK-MB que todavía queda. En tal caso se utilizaban anticuerpos tanto precipitantes como también inhibidores. Sin embargo, una desventaja consistía en que en tal caso se inhibe también la enzima híbrida CK-MB hasta en un 80% (Clin. Chim. Acta, 58, 223-232 (1975)). Ciertamente ya era sabido obtener anticuerpos, que inhiben totalmente el tipo muscular CK-MM y no inhiben de ningún modo el tipo cerebral CK-BB (Immuno-

chemistry, volumen 6, 681-687 (1969)). Aunque en el caso -  
de tales anticuerpos no se inhibe de ningún modo la subuni-  
dad B en la enzima híbrida CK-MB y, por lo tanto, con ello  
se aumenta la confiabilidad del método de determinación, -  
5 también este procedimiento posee todavía considerables des-  
ventajas. En efecto, se ha manifestado que, incluso en el  
caso de utilizarse antígenos purísimos (CK-MM), los anima-  
les utilizados para la formación de anticuerpos proporciona  
ban predominantemente un suero, que inhibía la enzima híbri-  
10 da CK-MB en más de 55%, la mayor parte de las veces entre  
60 y 90%. Por lo tanto era necesario, en el caso de cada -  
animal individual utilizado para la inmunización, investi-  
gar si los anticuerpos formados inhibían la CK-MB sólo en  
50% o lo hacían más intensamente. Aparte del gasto causado  
15 por ello, esto da lugar a que no se pueda utilizar prácti-  
camente la mayor parte de los sueros obtenidos, puesto que  
siempre aparecen diferentes grados de inhibición. También  
sueros reunidos eliminan sólo parcialmente esta dificultad.  
A esto se agrega además que es extremadamente pequeña la -  
20 cantidad de CK-MB en el suero en el caso de infarto cardí-  
co y que en el caso de anticuerpos, que de nuevo excluyen  
una parte considerable de la misma se disminuye grandemen-  
te la confiabilidad del procedimiento.

El invento se basa en la misión de eliminar estas -  
25 desventajas y crear un procedimiento del tipo indicado, que  
haga posible especialmente poder emplear también anticuer-  
pos que inhiben a la CK-MM totalmente, pero en más de 55%

a la CK-MB, de forma tal que se pueda determinar toda la actividad de la subunidad B contenida en la enzima híbrida CK-MB.

5           Esta misión es resuelta conforme al invento mediante un procedimiento para la determinación de la creatinquinasa-MB en el suero, mediante exclusión inmunológica de la subunidad M y medición de la subunidad B según métodos conocidos para la determinación de la creatinquinasa, el cual procedimiento está caracterizado porque para la exclusión de la subunidad M en la carga de reacción a partir de anticuerpos contra la subunidad M se añaden fragmentos munovalentes obtenidos por desdoblamiento proteolítico en condiciones reductoras.

10

          Ciertamente es sabido que no solamente las enzimas son inhibidas por los anticuerpos naturales que pertenecen a la fracción de IgG o a las  $\gamma$ -globulinas y tienen un peso molecular de aproximadamente 130.000 hasta 210.000, sino - que también por desdoblamiento proteolítico de estos anticuerpos resultan fragmentos, que ciertamente han perdido la capacidad de precipitación, puesto que son solamente monovalentes a diferencia de los anticuerpos divalentes, pero que sin embargo las propiedades inhibitorias de fragmentos monovalentes se diferencian sólo escasamente de las de los anticuerpos divalentes (Kontakte 3/78, 10-17). Estos fragmentos son designados como fragmentos FAB (Biochem. J. 73, 119-126 (1959); Immunochem. 4, 369 (1967)).

15

20

25

Sorprendentemente se ha hallado ahora que esto no

ocurre en el presente caso, sino que a partir de anticuerpos, que inhiben totalmente la CK-MM y la CK-MB en más de 55%, especialmente en 60 hasta 90%, se obtienen fragmentos monovalentes (fragmentos FAB), que siguen inhibiendo totalmente la CK-MM, a saber en 99 hasta 100%, pero que inhiben la CK-MB sólo hasta 50% dentro del margen de los límites de errores. De este modo se hace posible emplear para la determinación de la CK-MB antisueros obtenidos a partir de animales de experimentación apropiados, tales como corderos, conejos, gallinas y similares, sin que de antemano se deban separar por costosos métodos analíticos los antisueros que inhiben la CK-MB en más de aproximadamente 53%. En lugar de ello se ha hecho posible ahora desdoblar por medios proteolíticos en condiciones reductoras los sueros, sin retamación previa de sus propiedades inhibitorias y excluir entonces específicamente con los fragmentos de desdoblamiento la subunidad M de la CK, independientemente de que esté presente en la enzima muscular CK-MM o en la enzima híbrida CK-MB. Preferiblemente, dentro del marco del invento se utilizan fragmentos monovalentes, que se obtienen a partir de anticuerpos, que inhiben a la enzima híbrida CK-MB en más de 55%, de modo especialmente preferido en 60 a 90% y totalmente a la isoenzima de tipo muscular CK-MM.

Conforme a otra forma preferida de realización del invento se utilizan los fragmentos monovalentes, a partir de los cuales han sido separados anticuerpos completos reagentes y los fragmentos cristalizables ( $F_c$ ). La separación

puede efectuarse conforme a métodos conocidos, por ejemplo mediante cromatografía a través de gel o por diálisis frente a solución de sal y precipitación con sulfato de zinc (Immunochem. 14, 99 (1977)).

5 Los fragmentos monovalentes obtenidos de modo conocido, los cuales, como se ha mencionado, son purificados preferiblemente de anticuerpos y fragmentos  $F_c$ , pueden emplearse como tales en el procedimiento del invento. Sin embargo, se prefieren fragmentos monovalentes cuyos grupos  
10 SH habían sido alcoholados de antemano. Son apropiados los agentes de alcoholación que son activos en el medio acuoso a valores de pH, que no modifican la estructura terciaria de proteínas. Ejemplos de ellos son yodoacetato y yodoacetamida, utilizándose preferiblemente esta última, puesto  
15 que es capaz de inactivar simultáneamente las enzimas proteolíticas empleadas para la preparación de los fragmentos.

En la preparación de los antisueros necesarios para la obtención de los fragmentos FAB utilizados conforme al invento, pasan a utilizarse los métodos usuales de inmunización que se describen de modo múltiple en la bibliografía. Se hace mención, por ejemplo, a "Methods of Immunology and Immunochemistry", tomo 4, páginas 313 y siguientes (1976), especialmente página 336. Generalmente, en el  
20 caso de la inmunización se trata de utilizar antígenos lo más puros posibles e inmunizarlos durante un tiempo suficientemente largo. Los métodos generales son descritos por  
25 ejemplo en "Immunologische Arbeitsmethoden" VEB Editorial

Gustav Fischer Jena, 1976, 368-370 y "Microbiology", Editorial Harper & Row, Nueva York, 1970, 458/459. Isoenzimas CK-MM (antígenos) puros, apropiadas para la inmunización, pueden obtenerse según ABB 150, 648-678 (1972), añadiéndose convenientemente al tampón durante el aislamiento y la purificación ditiotreitól para su estabilización.

A partir de los antisueros se obtiene de modo usual la fracción de IgG o la gamma-globulina y a continuación, en condiciones reductoras, se desdobra con una enzima proteolítica, que ataca a la región de articulación. Ejemplos de - ello son papaína y pepsina. El desdoblamiento está descrito, por ejemplo, en "The Antibody Molecule", Academic Press Nueva York, 1975, 322-326. Para la producción de las condiciones reductoras se añaden en general compuestos que contienen grupos SH, por ejemplo cisteína, mercaptoetanol y compuestos similares. La incubación con la enzima proteolítica es detenida, cuando se ha completado el desdoblamiento, convenientemente por adición de uno de los conocidos agentes inactivadores. Tal como ya se ha mencionado más arriba, en el marco del invento se utiliza preferiblemente yodoacetamida. Los grupos SH libres, resultantes en el desdoblamiento, de los fragmentos FAB son alcoholados mediante este agente de detención. Fragmentos FAB tratados de este modo son especialmente bien idóneos dentro del marco del invento, especialmente cuando también se eliminan además anticuerpos restantes y fragmentos  $F_c$ . La inhibición de la CK-MB se efectúa entonces totalmente sin aparición de precipitados y prácti-

camente es exactamente de 50%. Sin embargo, dentro del marco del invento se pueden utilizar también los fragmentos FAB que no están alcoholizados o no han sido purificados - respecto de sustancias acompañantes o impurezas, aún cuando de este modo también se obtiene un error algo mayor en la determinación, el cual sin embargo se sigue encontrando todavía dentro del marco de valores bien utilizables, es decir inhibe la enzima híbrida en  $50\% \pm 3\%$ .

La determinación de la subunidad B en la enzima híbrida CK-MB después de la adición de los anticuerpos monovalentes se efectúa entonces según los métodos conocidos - en general para la determinación de CK, que parten de creatina o creatinfosfato como sustrato. Procedimientos apropiados son descritos, por ejemplos, en "Methoden der enzymatischen Analyse", de H. U. Bergmeyer, Editorial Chemie, tomo 1, 3ª edición, páginas 813-825. Un procedimiento especialmente apropiado a causa de su elevada sensibilidad, ha sido descrito en la solicitud de patente alemana P... (presentada el 2 de marzo de 1979 con el número interno 2292 por la misma solicitante que la presente). Este método utiliza la reacción de luciferina-luciferasa y mide cinéticamente la cantidad de luz emitida.

El procedimiento conforme al invento hace posible el empleo de antisueros contra CK-MM con el fin de realizar la determinación cuantitativa de CK-MB, que se había obtenido según uno cualquiera de los métodos de inmunización descritos en la bibliografía y que hasta ahora, a causa de una

inhibición demasiado grande de CK-MB, no eran utilizables en el suero, para un ensayo confiable en cuanto a CK-MB - desde el punto de vista diagnóstico. También antisueros, que además de la inhibición provocan precipitación, pueden ser  
5 utilizados conforme al invento. Los antisueros con inhibición demasiado elevada de CK-MB resultantes en grado muy - considerable incluso en métodos de inmunización muy perfeccionados, ya no necesitan ser separados y se prescinde de la técnica analítica costosa para la diferenciación entre  
10 antisueros utilizables y antisueros no utilizables. Esto último es especialmente importante, puesto que la experimentación de la inhibición de la CK-MB de un antisuero sólo es posible en preparados CK-MB obtenidos a partir de suero recientemente recogido de pacientes con infarto cardíaco.  
15 La supresión del ensayo de inhibición conduce por consiguiente a una considerable simplificación.

Los siguientes ejemplos explican el invento adicionalmente.

#### EJEMPLO 1

20 a) Preparación de la fracción de IgG.

Sueros de corderos, que habían sido inmunizados con CK-MM humano según el esquema descrito en "Immunologische Arbeitsmethoden", loc. cit., es mezclado hasta 1,8 M con sulfato amónico cristalino a 0 hasta 4°C y pH 7. Después de -  
25 centrifugación, el precipitado es disuelto en tampón TRIS 0,1 M/NaCl 0,15 M, pH 8, y es dializado de modo abundante

frente a tampón de fosfato 10 mM, pH 7,1. El dializado clarificado de nuevo mediante centrifugación es aplicado sobre una columna, que está llena con DEAE-celulosa. La fracción que ha pasado, que contiene proteínas y el eluato, que se obtiene con tampón de fosfato 15 mM/NaCl 10 mM, pH 7,1, son reunidos y contienen más de 95% de IgG.

b) Desdoblamiento con papaína.

Se incubaba IgG según el procedimiento descrito en - Immunochem. 4 (1967) 369 en condiciones reductoras (10 mM de cisteína) con 1,5% de papaína (% en peso, referido a la cantidad de proteína-IgG) a pH 7,5 durante 5 horas a 37°C. Al final de la fase de incubación se detiene la acción de enzimas mediante un exceso de yodoacetamida y para la alcoholación de grupos SH libres se incubaba a pH 7,5 durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla de desdoblamiento estabilizada contiene fragmentos FAB, fragmentos  $F_c$  y <10% de IgG no desdoblado. El rendimiento de reactividad inmune es mejor de 75%.

c) Purificación de los fragmentos FAB

Tras concentración a 30 mg/ml por ultrafiltración, la mezcla de desdoblamiento es separada por cromatografía a través de gel (The LKB Instrument Journal 24, (1977) 10). Los fragmentos FAB son eluidos como último pico proteínico bien separados de IgG y fragmentos  $F_c$ . La fracción FAB después de concentración puede ser empleada mediante ultrafiltración directamente para la inhibición de CK-MM o de CK-MB. La inhibición de CK-MB está dentro del marco del lími-

te de errores de 50%. La inhibición de CK-MM está en 99 a 100%.

## EJEMPLO 2

- 5 a) Preparación de la fracción de  $\gamma$ -globulina a partir de plasma de cordero.

Plasma con citrato obtenido de corderos, que habían sido inmunizados durante 4 a 6 meses con CK-MM, es mezclado hasta 25 mM con cloruro de calcio y para la coagulación es formulado a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 te 2 horas. Después de descomposición mecánica del producto coagulado se diluye con 1 volumen de solución fisiológica de NaCl y es mezclado con 2% de agente de floculación de silicato (Aerosil) para la adsorción de lipoproteínas.

Mediante centrifugación se obtiene la porción sobrenadante transparente. A partir de la porción sobrenadante se precipita la fracción de  $\gamma$ -globulina a 0 hasta 4°C y pH 7 con sulfato de amonio 1,8 M, y se recoge y reúne para la centrifugación. Mediante diálisis frente a tampón TRIS 50 mM/NaCl 0,1 M, pH 7,5 y concentración por ultrafiltración 20 se obtiene un preparado de anticuerpos idóneo para el desdoblamiento enzimático.

- b) Desdoblamiento con papaína.

Se procede como se describe en el Ejemplo 1b), pero se modifica ligeramente para la fracción de  $\gamma$ -globulina. Se 25 utiliza 1,5% de papaína referido a un gramo de proteína de la fracción de  $\gamma$ -globulina y el tiempo de incubación es de

20 horas a 25°C. Las demás condiciones son iguales.

c) Purificación de la fracción FAB.

La mezcla de desdoblamiento alcoholada es dializada frente a solución fisiológica de sal común, y luego es mezclada con 25 mM de sulfato de zinc (Immunochem. 14 (1977) 99). De este modo se precipitan restos de IgG no desdoblado y fragmentos  $F_c$  y se separan por centrifugación. Los fragmentos FAB remanentes después de diálisis y concentración están prestos para utilizarse en el ensayo de CK-MB. El rendimiento es mayor de 80% de la actividad inhibitora para isoenzima CK-MM, referido al plasma de partida. La CK-MB es inhibida hasta 50% independientemente del valor de inhibición para los anticuerpos no desdoblados. Los resultados obtenidos con diferentes sueros los muestra la siguiente tabla.

15

TABLA

Animal Nº	% de inhibición de la actividad de enzima			
	CK-MM (600-1000 U/l)		CK-MB (200-400 U/l)	
	Suero de partida (plasma)	Fragmentos FAB	Suero de partida	Fragmentos FAB
20 1	99,5	99,5	62	52
2	99,6	99,7	56	53
3	99,3	99,1	64	49
4	98,5	99,3	68	52

- REIVINDICACIONES -

1.- Procedimiento para la determinación de la creatinquinasa-MB en el suero por exclusión inmunológica de la subunidad M y medición de la subunidad B conforme a métodos conocidos para la determinación de la creatinquinasa, caracterizado porque para la exclusión de la subunidad M en la carga de reacción se añaden fragmentos monovalentes obtenidos a partir de anticuerpos contra la subunidad M por desdoblamiento proteolítico en condiciones reductoras.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se utilizan fragmentos monovalentes que se obtienen a partir de anticuerpos, que inhiben en más de 55% a la enzima híbrida CK-MB y totalmente a la isoenzima CK-MM.

3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque se utilizan fragmentos monovalentes de anticuerpos, que inhiben en 60 hasta 90% la enzima híbrida CK-MB.

4.- Procedimiento según una de las precedentes reivindicaciones, caracterizado porque se utilizan fragmentos monovalentes, a partir de los cuales se han separado los restos anticuerpos completos y los fragmentos cristalizables ( $F_c$ ).

5.- Procedimiento según una de las precedentes reivindicaciones, caracterizado porque se añaden fragmentos monovalentes, cuyos grupos SH están alcoholados.

6.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque se añaden fragmentos monovalentes alcoholados con yodoacetamida o yodoacetato.

7.- Procedimiento según una de las precedentes reivindicaciones, caracterizado porque se determina la su bunidad B con ayuda de la reacción de luciferina-luciferasa y se mide cinéticamente la cantidad de luz emitida.

5 8.- "PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION DE LA CREATINQUINASA MB".

Tal como se describe y reivindica en la presente Memoria Descriptiva, que consta de trece hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 20 FEB. 1980  
CARLOS FERNANDEZ ARDELAS  
D P