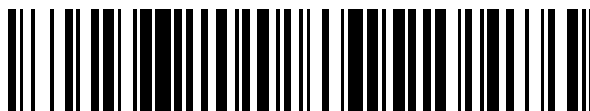


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 330**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2008 E 08252839 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 2031392**

54 Título: **Uso de sulfato de condroitina para reducir la unión no específica en inmunoensayos de troponina I**

30 Prioridad:

28.08.2007 US 846390

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.12.2014

73 Titular/es:

**ORTHO-CLINICAL DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)
1001 US HIGHWAY 202
RARITAN, NJ 08869, US**

72 Inventor/es:

**SANKARAN, BANUMATHI;
SULLIVAN, SHERYL S.;
HAYNES, DARRELL C.;
HOSIMER, PHILIP C. y
YEARWOOD, GRAHAM**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 525 330 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de sulfato de condroitina para reducir la unión no específica en inmunoensayos de troponina I

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere al campo de los inmunoensayos, y más particularmente al campo de los glucosaminoglicanos para reducir la unión no específica en inmunoensayos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se usan ampliamente ensayos de unión bioquímicos para determinar la presencia y la concentración de analitos en especímenes biológicos. Tales ensayos se basan en el concepto de componentes de unión. Un analito de interés se une a un agente de unión al analito (tal como, por ejemplo, un anticuerpo para el analito, o un receptor para el analito), y el analito y el agente de unión al analito se denominan por consiguiente "componentes de unión". Si uno de los componentes de unión está unido a una fase sólida, el ensayo se denomina un ensayo heterogéneo. Tales ensayos heterogéneos incluyen, por ejemplo, el procedimiento de sándwich, el procedimiento indirecto y el procedimiento competitivo, todos los términos fácilmente reconocidos en la materia.

20 La sensibilidad de un ensayo normalmente se refiere a la masa más pequeña del analito que genera un cambio estadísticamente significativo en la señal generada por el ensayo cuando se compara con la lectura de la señal obtenida en ausencia del analito. Se desea elevada sensibilidad debido a que permite la detección de cantidades más pequeñas de analito, además de una medición de mayor precisión total de un analito.

25 Unión no específica se refiere a interacciones no específicas de los componentes de unión en un sistema de ensayo heterogéneo con una fase sólida. La unión no específica frecuentemente reduce la sensibilidad de los ensayos heterogéneos y, por tanto, es deseable reducir tal unión no específica.

30 Se conocen varios procedimientos para este fin. Por ejemplo, se han añadido proteínas, tales como albúmina de suero bovino (BSA), gelatina y caseína, a reactivos de ensayo o preadsorbido sobre la fase sólida con el fin de bloquear sitios de adsorción no específicos. Adicionalmente, se ha informado del uso de diversos tensioactivos, frecuentemente a alta concentración, en la bibliografía.

35 El documento WO 2004/092733 describe el uso de un polímero cargado para mejorar la separación de complejos usando un canal de separación en un dispositivo microfluídico. El documento WO 2004/092733 también desvela que el polímero cargado puede bloquear la interferencia con el ensayo de desplazamiento de la migración interaccionando con los constituyentes de muestra que interfieren con el ensayo. El documento JP H02 238361 desvela un reactivo de inmunoensayo que comprende sulfato de condroitina para su uso con antígenos o anticuerpos de analito. El documento JP H02 238361 también desvela que el sulfato de condroitina no disminuye reacciones específicas. Roberts y col. (Clin. Chem. 43, 5, pág. 860-861, 1997) desvela un inmunoensayo para troponina I.

45 Aunque estas técnicas pueden ayudar a reducir alguna adsorción no específica, muchas de las técnicas se han asociado a interferencia con la interacción específica deseada de los componentes de unión. Estas técnicas pueden también conducir al desplazamiento del complejo que se forma entre los componentes de unión. Adicionalmente, a pesar del uso de altas concentraciones de proteína y tensioactivo, normalmente todavía existe una cantidad considerable de unión no específica en muchos ensayos heterogéneos. Por consiguiente, se necesitan medios alternativos para reducir la unión no específica en ensayos heterogéneos.

50 Esto es especialmente cierto en el caso de ensayos para troponina I cardíaca en los que los niveles de analito que se detectan son muy pequeños y es necesaria elevada sensibilidad para resultados de ensayo precisos y útiles. La medición de troponina I cardíaca ayuda en el diagnóstico preciso de infarto agudo de miocardio y en la estratificación del riesgo de pacientes con síndromes coronarios agudos sin elevación del segmento ST con respecto a riesgo relativo de mortalidad, infarto de miocardio, o elevada probabilidad de acontecimientos isquémicos que requieren procedimientos de revascularización urgentes.

55 La troponina I (TnI) es una proteína normalmente encontrada en tejido de músculo que, conjuntamente con la troponina T y la troponina C, regula la interacción dependiente de calcio de actina y miosina (Tobacman, Annu Rev Physiol 58:447-481, 1996). Se han identificado tres isotipos de TnI: uno asociado a músculo esquelético de sacudida rápida, uno con músculo esquelético de sacudida lenta, y uno con músculo cardíaco (Wilkinson y Grand, Nature 271:31-35, 1978; Bodor, J Clin Immunoassay 17(1):40-44, 1994). La forma cardíaca tiene 31 residuos de aminoácidos adicionales en el extremo N y es la única isoforma de troponina presente en el miocardio (Vallins y col., FEBS Letts 270(1,2):57-61, 1990)

65 Estudios clínicos han demostrado que la troponina I cardíaca (cTnI) es detectable en la circulación sanguínea 4-6 horas después de un infarto de miocardio agudo (IMA) y sigue siendo elevada durante varios días después (Mair y

col., Clin Chem 41(9):1266-1272, 1995; Larue y col., Clin Chem 39(6):972-979, 1993). Así, la elevación de cTnI cubre las ventanas de diagnóstico de tanto la creatina cinasa-MB (CK-MB) como la lactato deshidrogenasa (Bodor, J Clin Immunoassay 17(1):40-44, 1994). Otros estudios han indicado que cTnI tiene una mayor especificidad clínica por lesión miocárdica que CK-MB (Adams y col., Circulation 88(1):101-106, 1993; Apple y col., Clin Chim Acta 237:59-66, 1995).

Debido a su especificidad y sensibilidad cardíaca, la cTnI se ha usado como un marcador fidedigno en la evaluación de pacientes con angina inestable y síndrome coronario agudo (SCA) sin elevación del segmento ST. Estudios clínicos previos de pacientes con SCA (Lindahl y col., J Am Coll Cardiol 38:1497-1498, 2001; Venge y col., Am J Cardiol 89:1035-1041, 2002) han mostrado que aumentos menores en los valores de cTnI proporcionan importante información de pronóstico sobre el riesgo de muerte a corto y largo plazo (Galvani y col., Circulation 95:2053-2059, 1997; Antman y col., N Eng J Med 335:1342-1349, 1996; Ottani y col., Am Heart J 40:917-927, 2000; Heidenreich y col., J Am Coll Cardiol 38:478-485, 2001). Por último lugar, la evaluación del pronóstico puede ser útil en identificar pacientes que lo más probablemente se beneficiarán de intervenciones terapéuticas específicas.

Así, se desea cualquier reactivo y procedimiento para reducir la unión no específica en ensayos heterogéneos para cTnI, conduciendo así al aumento de la sensibilidad de ensayos cTnI.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

Para este fin, la invención proporciona un reactivo de inmunoensayo que comprende un agente de unión al analito en un diluyente, y sulfato de condroitina en una cantidad suficiente para reducir la unión no específica en un ensayo de una muestra para el analito, en el que el analito es troponina I, en el que el agente de unión al analito es un anticuerpo para el analito o un receptor para el analito.

En una realización presentemente preferida, el analito es troponina I, el agente de unión al analito es un anticuerpo monoclonal anti-troponina I y el glucosaminoglicano es sulfato de condroitina.

Adicionalmente se proporciona una composición de muestra que comprende una muestra que va a ensayarse para la presencia de un analito, un agente de unión al analito en un diluyente y sulfato de condroitina en una cantidad suficiente para reducir la unión no específica en un ensayo de la muestra para el analito, en la que el analito es troponina I, en la que el agente de unión al analito es un anticuerpo para el analito o un receptor para el analito.

En una realización presentemente preferida, la muestra es suero o plasma con EDTA, el analito es troponina I, el agente de unión al analito es un anticuerpo monoclonal anti-troponina I y el glucosaminoglicano es sulfato de condroitina.

También se proporcionan procedimientos de detección de troponina I en una muestra, usando sulfato de condroitina para reducir la unión no específica en el procedimiento. El procedimiento comprende combinar una muestra que va a analizarse para la presencia de un analito con sulfato de condroitina y un agente de unión al analito en un diluyente, de manera que se forme un complejo de cualquier analito presente en la muestra y el agente de unión al analito, en los que el sulfato de condroitina reduce la unión no específica en el procedimiento, y detección del complejo resultante de manera que se detecte el analito. En el procedimiento, el analito es troponina I, y el glucosaminoglicano es sulfato de condroitina, y el reactivo de unión al analito es como se ha definido previamente.

Características y ventajas adicionales de la invención objeto serán evidentes a partir de la descripción que sigue cuando se considera conjuntamente con las figuras adjuntas.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 muestra resultados del ensayo de Tropl cuando diversos azúcares se enriquecen en especímenes de Tropl solitarios;

la Fig. 2 muestra resultados del ensayo de Tropl cuando el reactivo BJ se formuló con sulfato de condroitina a 0, 1, 2 y 4 mg/ml en presencia o ausencia de EDTA;

la Fig. 3 muestra resultados del ensayo de Tropl con y sin la adición de 0,5 mg/ml de CSC en el reactivo BJ;

la Fig. 4 muestra resultados del ensayo de Tropl cuando el reactivo BJ se formuló con diversos isómeros de sulfato de condroitina en comparación con el lote del kit (sin sulfato de condroitina); y

la Fig. 5 ilustra los principios del ensayo de troponina I cardíaca.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La invención proporciona un reactivo de inmunoensayo como se define en las reivindicaciones.

Como se trata anteriormente, es frecuentemente deseable determinar la presencia y la concentración de analitos en especímenes biológicos. Un analito es una sustancia o constituyente químico que se determina en un procedimiento analítico (tal como un inmunoensayo). Los inmunoensayos se basan en el concepto de componentes de unión. Un

analito de interés se une a un agente de unión al analito (es decir, un anticuerpo para el analito, o un receptor para el analito), y el analito y el agente de unión al analito se denominan entonces “componentes de unión”.

5 En muchos inmunoensayos, el agente de unión al analito es un anticuerpo. Tales anticuerpos se proporcionan frecuentemente en un diluyente tal como tampón fosfato potásico. El anticuerpo puede ser de cualquier clase de inmunoglobulina, que incluye, por ejemplo, IgG o IgM. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. En un inmunoensayo de tipo sándwich, el analito puede ser capturado usando un anticuerpo o anticuerpos inmovilizados sobre una fase sólida. Tal inmovilización puede llevarse a cabo usando técnicas conocidas en la técnica, que incluyen el uso de una fase sólida recubierta con estreptavidina (SAC), a la que se unen el anticuerpo o los anticuerpos de captura marcados con biotina. El analito de interés presente en una muestra se une al anticuerpo o los anticuerpos de captura inmovilizados, y entonces el anticuerpo o anticuerpos marcados se unen a su vez al analito capturado. La marca puede ser cualquiera conocida en la técnica, e incluye, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina. Entonces, la señal detectada es indicativa de la cantidad de analito presente en la muestra. El procedimiento de detección dependerá del tipo de marca elegido, como se conoce en la técnica, y podría incluir procedimientos colorimétricos, fluorimétricos o quimioluminiscentes.

20 El glucosaminoglicano (GAG) usado en la invención es sulfato de condroitina, aunque también pueden usarse otros GAG. Estos otros GAG incluyen hialuronato (también llamado ácido hialurónico), sulfato de heparano, heparina, sulfato de dermatano y sulfato de queratano. El sulfato de condroitina puede ser sulfato de condroitina A, sulfato de condroitina B (ahora denominado sulfato de dermatano), sulfato de condroitina C, o una mezcla de los mismos.

25 Los glucosaminoglicanos (GAG) o mucopolisacáridos son polisacáridos no ramificados largos que contienen una unidad de disacárido de repetición. La unidades de disacárido contienen cualquiera de los dos azúcares modificados, N-acetilgalactosamina (GalNAc) o N-acetilglucosamina (GlcNAc), y un ácido urónico tal como glucuronato o iduronato. Los hialuronatos están compuestos de D-glucuronato y GlcNAc. Los sulfatos de dermatano están compuestos de ácido D-glucurónico (GlcA) o L-iduronato (IdoA) y GalNAc-sulfato. La heterogeneidad en el sulfato de dermatano resulta de grados variables de O-sulfatación y de la presencia de los dos ácidos urónicos. Los sulfatos de condroitina están compuestos de D-glucuronato y GalNAc-6 (o 4)-sulfato. La heparina y los sulfatos de heparano están compuestos de D-glucuronato-2-sulfato y N-sulfo-D-glucosamina-6-sulfato (los heparanos tienen menos sulfato que las heparinas). Los sulfatos de queratano están compuestos de galactosa y galactosa-6-sulfato y GlcNAc-6-sulfato.

35 El sulfato de condroitina (SC) es un glucosaminoglicano sulfatado (GAG). Una cadena de condroitina puede tener más de 100 azúcares individuales, cada uno de los cuales puede estar sulfatado en posiciones y cantidades variables. Sulfato de condroitina A se refiere a SC predominantemente sulfatado en el carbono 4 del azúcar de GalNAc (condroitina-4-sulfato). El sulfato de condroitina B se denomina ahora sulfato de dermatano. El sulfato de condroitina C se refiere a SC predominantemente sulfatado en el carbono 6 del azúcar de GalNAc (condroitina-6-sulfato). El sulfato de condroitina D se refiere a SC predominantemente sulfatado en el carbono 2 de GlcA y 6 del azúcar de GalNAc (condroitina-4,6-sulfato).

40 El sulfato de condroitina se proporciona en una cantidad suficiente para reducir la unión no específica en un ensayo de una muestra para troponina I. La cantidad de sulfato de condroitina es preferentemente de aproximadamente 0,25 mg/ml a aproximadamente 4 mg/ml (equivalente a aproximadamente el 0,025 % a aproximadamente el 0,4 %). En una realización específica, el sulfato de condroitina está presente en una cantidad de 1 mg/ml (equivalente al 0,1 %). Los ejemplos que siguen detallan cómo determinar una cantidad adecuada de sulfato de condroitina para utilizarla según la invención objeto.

50 La muestra que va a analizarse para la presencia de analito puede ser cualquier muestra adecuada, preferentemente una muestra de sangre tal como una muestra de suero o muestra de plasma. El plasma sanguíneo es el componente líquido de la sangre en el que se suspenden los glóbulos sanguíneos. Una forma simple de separar plasma de glóbulos sanguíneos en una muestra de sangre es por centrifugación. Suero se refiere a plasma sanguíneo del que se han extraído naturalmente los factores de coagulación, permitiendo que la sangre coagule antes de aislar el componente líquido. Las muestras de plasma se obtienen de tubos de sangre que contienen anticoagulantes tales como heparina sódica, citrato de sodio, fluoruro de sodio y oxalato de potasio o EDTA potásico (ácido etilendiaminatetraacético). En el caso de una muestra de plasma según la invención objeto, el plasma se obtiene preferentemente usando un anticoagulante distinto de heparina.

60 El reactivo de inmunoensayo de la invención objeto, en una realización, comprende un anticuerpo monoclonal específico para troponina I cardíaca en un diluyente, y 0,1% de sulfato de condroitina. Anticuerpos adecuados para troponina I cardíaca se conocen en la técnica y pares particulares o combinaciones de anticuerpos son frecuentemente recomendados como componentes de ensayo. Los anticuerpos de uso particular en el presente documento son los anticuerpos monoclonales designados 19C7 y 24-40 como anticuerpos de captura duales, marcados con biotina para la unión a un pocillo recubierto con estreptavidina, y el anticuerpo designado 16A11 como anticuerpo de detección, marcado con peroxidasa de rábano picante. Estos anticuerpos están comercialmente disponibles (véanse las fuentes citadas más adelante) y se tratan durante toda la bibliografía en relación con ensayos para troponina I cardíaca, y también son muy conocidos procedimientos de biotinilación y marcado en la

técnica.

5 La discusión anterior se refiere a un reactivo de inmunoensayo que comprende sulfato de condroitina en una cantidad suficiente para reducir la unión no específica. El sulfato de condroitina puede estar presente en el diluyente que contiene el anticuerpo. Alternativamente, el sulfato de condroitina puede añadirse a una composición de muestra, a la que entonces se añade el agente de unión al analito. El orden de combinación puede variar, en tanto que el sulfato de condroitina se introduzca antes de la unión no específica de cualquier analito presente en la muestra al agente de unión al analito.

10 Así, adicionalmente se proporciona una composición de muestra que comprende una muestra que va a ensayarse para la presencia de troponina I, un agente de unión al analito y sulfato de condroitina en una cantidad suficiente para reducir la unión no específica en un ensayo de la muestra para troponina I.

15 En una realización presentemente preferida, la muestra es suero o plasma con EDTA, el analito es troponina I, el agente de unión al analito es un anticuerpo monoclonal anti-troponina I y el glucosaminoglicano es sulfato de condroitina.

20 También se proporciona un procedimiento de detección de un analito en una muestra que comprende: combinar una muestra que va a analizarse para la presencia de un analito con un glucosaminoglicano y un agente de unión al analito, de manera que se forme un complejo de cualquier analito presente en la muestra y el agente de unión al analito, en el que el glucosaminoglicano reduce la unión no específica en el procedimiento; y detectar el complejo resultante de manera que se detecte el analito. En una realización, la muestra se combina con el glucosaminoglicano y la muestra resultante se combina a continuación con el agente de unión al analito. En otra realización, la muestra se combina con el agente de unión al analito y la muestra resultante se combina a continuación con el glucosaminoglicano. En otra realización más, el agente de unión al analito se proporciona como un reactivo de inmunoensayo que comprende el agente de unión al analito en un diluyente y el glucosaminoglicano, y el reactivo de inmunoensayo se combina con la muestra. En cada uno de estos procedimientos, el analito es troponina I y el glucosaminoglicano es sulfato de condroitina.

30 En la composición y procedimientos de muestra según la invención objeto, los diversos agentes de unión al analito, diluyente, glucosaminoglicanos, muestras y analitos adecuados son como se han tratado anteriormente en relación con el reactivo de inmunoensayo.

35 Los reactivos, composiciones y procedimientos de la invención objeto son útiles en un inmunoensayo para troponina I cardíaca. Más detalles de esta realización se proporcionan en los siguientes ejemplos.

Ejemplo I Efecto de la adición de los reactivos de captura (BJ) y de detección (CJ) del ensayo de heparina a troponina I cardíaca (cTnl o Tropl)

40 El objetivo de este experimento era determinar si la adición de heparina a los reactivos de BJ y/o CJ de Tropl proporciona mitigación de los resultados de Tropl positivos falsos. Se recibieron numerosos informes de resultados de troponina I falsamente elevada reproducibles en muestras de suero. También se recibieron varios informes de resultados de Tropl falsamente elevada en plasma con EDTA. En varios casos, la coincidencia de los especímenes de plasma con heparina obtenidos del mismo paciente no mostró resultados de Tropl falsamente elevados.

45 El experimento implicó el enriquecimiento de heparina en los reactivos BJ y CJ y a continuación se realizó el ensayo usando estos reactivos con muestras de Tropl solitarias que se había mostrado previamente que daban resultados de Tropl positivos falsos.

50 Los resultados muestran que se encontró que la heparina enriquecida en CJ de Tropl y ejecutada inmediatamente disminuyó gravemente la señal recuperada. En solo 10 unidades por ml de CJ, la señal del Cal 2 (calibrador 2) recuperado fue inferior al 50 % de la nominal. Por el contrario, los niveles de heparina en plasma con heparina son normalmente 25-50 unidades/ml. Para dar una concentración equivalente de heparina administrada por el reactivo CJ se requeriría que la heparina estuviera presente a un nivel de 50-100 unidades/ml. Basándose en estas respuestas, no es factible añadir heparina a CJ a los niveles que serían equivalentes a plasma heparinado.

55 Usando un panel de especímenes de suero solitarios que se había identificado previamente como que mostraba resultados de Tropl positivos falsos, éstos se probaron con disolución de CJ que contenía 10 unidades de heparina por ml. Estos especímenes solitarios demostraron reducciones significativas en la concentración aparente de cTnl (troponina I cardíaca). La recuperación osciló del 8-35 % con especímenes que sin tratar se encontró que tenían concentraciones aparentes de cTnl de 0,7 - 7,0 ng/ml. Sin embargo, ninguno de estos especímenes se corrigió completamente a por debajo del límite de referencia superior (URL) para el suero.

65 Los resultados de este experimento conducen a las conclusiones de que cuando se añadía heparina a la formulación de CJ se producían reducciones sustanciales en la capacidad de señalización global para los reactivos. A concentraciones de heparina de 10 unidades por ml, la señal fue solo el 50 % de la nominal. Sin embargo, los

especímenes de pacientes solitarios se corrigieron parcialmente mediante la adición de este nivel de heparina a CJ. Sin embargo, corrección más completa de esta interferencia requeriría mayores niveles de heparina que probablemente reducirían la señal del ensayo a niveles incompatibles con el diseño del ensayo.

5 *Ejemplo II Efecto de azúcares como factores de corrección de muestras en el reactivo BJ*

10 El objetivo de este experimento era evaluar la capacidad de azúcares, tales como aquellos presentes en glucosaminoglicanos y aquellos normalmente asociados a las cadenas laterales de hidratos de carbono de peroxidasa de rábano picante (HRP), para mitigar los efectos de muestras de Tropl solitarias cuando se añadieron a los reactivos BJ.

15 Como se ha tratado en el ejemplo I, se mostró que la adición de heparina a muestras solitarias mitigaba los resultados positivos falsos. La heparina es un miembro de un grupo heterogéneo de mucopolisacáridos aniónicos de cadena lineal, llamados glucosaminoglicanos (GAG), que tienen propiedades anticoagulantes. Aunque pueden estar presentes otros, los principales azúcares que se producen en la heparina son: 2-sulfato de ácido α -L-idurónico; 6-sulfato de 2-desoxi-2-sulfamino- α -D-glucosa; ácido β -D-glucurónico; 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucosa; y ácido α -L-idurónico.

20 Como cribado inicial para posibles factores de corrección de muestras, los siguiente azúcares se enriquecieron en muestras de Tropl solitarias (para lograr una concentración final de 2 mg/ml de la sustancia de prueba) para evaluar la eficacia en el bloqueo de las reacciones positivas falsas: N-acetil-glucosamina (Sigma A8625); N-acetil-galactosamina (Sigma A2795); glucosamina (Sigma G4875); ácido N-acetilneuramínico (NANA, ácido siálico) (Sigma A0812); sulfato de condroitina C (Sigma C4384); quitina (homopolímero de N-acetil-glucosamina)(Sigma C9752); mucina (polímero de NANA) (Sigma M3895); y manosa (Sigma M8296). Se encontró que el sulfato de condroitina C (CSC) en este cribado inicial mitigaba significativamente los resultados positivos falsos (véase Fig. 1). Resultados aparentes de Tropl fueron generalmente suprimidos a por debajo del URL en todas las muestras, excepto una de las solitarias. Se cree que esta última muestra era positiva para anticuerpos heterófilos.

30 Basándose en estos estudios de selección iniciales, se realizaron experimentos de seguimiento en los que el sulfato de condroitina C (CSC) se añadió directamente al reactivo BJ en una serie de niveles crecientes (0,25, 0,5, 1, 2, 3 y 4 mg/ml), con y sin EDTA (5,58 mg/ml) en el reactivo BJ (véanse las Fig. 2 y 3). La eficacia de las formulaciones se basó en el bloqueo de las muestras solitarias de Tropl conjuntamente con una evaluación del cambio en las respuestas del calibrador de referencia. La concentración más baja de CSC que parece suprimir eficazmente las muestras de Tropl solitarias fue 0,25 mg/ml; a niveles de CSC ligeramente mayores (0,5 mg/ml) parece ser una ligera mejora incremental en el bloqueo. El efecto debido a la presencia o ausencia de EDTA con los aditivos de reactivo adicionales no fue significativo.

35 La adición de CSC a 0,25 - 0,5 mg/ml a la formulación de BJ tuvo poco efecto significativo sobre los controles de conjuntos de suero negativos o positivos. Además, las respuestas del calibrador de referencia demostraron poco cambio a bajos niveles para CSC. A niveles de CSC superiores a 1 mg/ml, normalmente hubo una reducción del 10-30 % en las respuestas.

40 Los resultados de este experimento conducen a la conclusión de que el sulfato de condroitina C es un agente de bloqueo eficaz para mitigar las reacciones de referencia no específicas (unión no específica) que se encontró que demostraron algunos especímenes de suero y plasma con EDTA. Mientras que el nivel de prueba más bajo (0,25 mg/ml) demostró reducciones significativas en las reacciones positivas falsas aparentes, niveles ligeramente mayores (0,5 mg/ml) pueden proporcionar una medida adicional de la seguridad para muestras que pueden contener mayores niveles del interferente. El nivel de EDTA en presencia de CSC no pareció tener un efecto significativo sobre las muestras solitarias.

50 Se observó que las adiciones de CSC al reactivo BJ tenían impacto perjudicial mínimo sobre la relación global de dosis-respuesta si se usan los calibradores de referencia de Tropl. A través de los ocho calibradores de referencia, los cambios inducidos por las concentraciones de CSC hasta 1 mg/ml fueron generalmente inferiores al 10 %. Por tanto, se esperaba que la adición de CSC a la formulación de BJ a concentraciones de 0,25 - 0,50 mg/ml tuviera de poco a ningún impacto significativo sobre la calibración de referencia.

55 *Ejemplo III Muestras solitarias con 0,05 % de CSC en BJ*

60 El objetivo de este experimento era probar muestras solitarias usando 0,5 mg/ml (0,05 %) de CSC en BJ. Las muestras solitarias predijeron positivos sin la adición de CSC y negativos con el 0,05 % de CSC añadido al diluyente de biotina. La adición de 0,05 % de CSC parece no tener efecto sobre la predicción de muestras positivas y negativas. Estos resultados se muestran en la Fig. 3.

65 *Ejemplo IV Realización comparativa de condroitina A, B y C*

El objetivo de este experimento era determinar si cualquier isómero de sulfato de condroitina ofrecería protección de

muestras solitarias. El sulfato de condroitina C que se usa en los experimentos anteriores es una mezcla de sulfato de condroitina C con algo de sulfato de condroitina A. La menor cantidad de sulfato de condroitina C en la mezcla es del 85 %. Como puede ser de hasta el 15 % del isómero A, los isómeros A, B y C se probaron para eficacia.

5 Los resultados obtenidos mostraron que todos los isómeros de sulfato de condroitina fueron satisfactorios en reducir la concentración observada de las muestras solitarias, y no hubo diferencia significativa entre los isómeros con respecto a la supresión del positivo falso (véase Fig. 4). Esto conduce a la conclusión de que el porcentaje de pureza del sulfato de condroitina, en cuanto a la concentración de isómeros A y B, no tiene efecto sobre la supresión de positivos falsos.

10

Ejemplo V El ensayo de troponina I cardíaca

15 Se usa una técnica de inmunoensayo inmunométrica (véase la Fig. 5), que implica la reacción simultánea de troponina I cardíaca presente en la muestra con anticuerpos biotinilados (anti-cTnI monoclonal de ratón: clon 19C7 que reconoce los aminoácidos 41-49 de troponina I y un segundo clon específico para la región de troponina I que comprende los aminoácidos 24-40) y un conjugado de anticuerpo marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (anti-cTnI monoclonal de ratón: clon 16A11 que reconoce los aminoácidos 87-91 de troponina I). Los mAb para troponina biotinilados reaccionan específicamente con la troponina I en una muestra para formar un complejo que se une a estreptavidina de un pocillo de SAC. Los materiales no unidos se eliminan lavando y el complejo de troponina se detecta usando el mAb marcado con HRP (que se une específicamente a un epítipo de troponina I que se diferencia del epítipo con el que se unen los mAb biotinilados). El conjugado de HRP unido se mide por una reacción luminiscente. Un reactivo que contiene sustratos luminogénicos (un derivado de luminol y una sal de perácido) y un agente de transferencia de electrones, se añade a los pocillos. La HRP en los conjugados unidos cataliza la oxidación del derivado de luminol, que produce luz. El agente de transferencia de electrones (una acetanilida sustituido) aumenta el nivel de luz producido y prolonga su emisión. Las señales de luz se leen por el sistema de inmunodiagnóstico VITROS™ (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, NJ). La cantidad de conjugado de HRP unido es directamente proporcional a la concentración de cTnI presente.

20 El protocolo de ensayo es del siguiente modo: 1) A un pocillo de SAC se añaden: 80 µl de muestra, 35 µl de reactivo de biotina (BJ) y 35 µl de reactivo de conjugado (CJ); 2) Incubar durante 10 minutos 40 segundos; 3) Lavar el pocillo de SAC; 4) Añadir 200 µl de reactivo de señal y medir la emisión de luz.

25 Los pocillos de SAC se producen recubriendo pocillos de poliestireno con estreptavidina. Brevemente, los pocillos de poliestireno se irradian primero con 3,5 MRad para optimizar la adsorción de proteínas. Se recubre albúmina de suero bovino biotinilada (B-BSA), producida acoplado químicamente la biotina con la BSA usando un éster activado comercialmente disponible (biotina-XX-NHS, Calbiochem, Nottingham, RU) sobre los pocillos de poliestireno. El recubrimiento se lleva a cabo incubando los pocillos con la disolución de B-BSA durante 10 minutos. La B-BSA se adsorbe físicamente y no se une covalentemente a la superficie de poliestireno. Los pocillos se lavan antes de recubrir con estreptavidina. La estreptavidina se recubre sobre los pocillos incubando una disolución de estreptavidina con la superficie cubierta de biotina durante 50 minutos. La interacción entre la estreptavidina y la biotina no es covalente, pero excepcionalmente fuerte (10^{15} l/mol). Los pocillos se lavan de nuevo antes de secar y almacenar.

30 La estreptavidina tiene cuatro sitios de unión para biotina y así después de la inmovilización de la estreptavidina sobre la superficie hay sitios de unión a biotina libres. Estos sitios de unión están disponibles para reaccionar con componentes biotinilados del ensayo.

El reactivo conjugado (CJ) comprende los siguientes componentes:

50

Componente	Cantidad g/l
Agua	849,3
K ₂ HPO ₄	13
KH ₂ PO ₄	17
Kathon	20
BSA 30 %	100
Clon del mAb 16A11 marcado con HRP	4 mg/l
pH	6,6

55

60 El ensayo de reactivo de captura (BJ) comprende los siguientes componentes:

65

ES 2 525 330 T3

	<u>Componente</u>	<u>Cantidad g/l</u>
5	Agua	
	K ₂ HPO ₄	13
	KH ₂ PO ₄	17
	Kathon	20
	Albúmina de suero bovino 30 %	100
	EDTA (equimolar disodio y trisodio)	15 mM
	Sulfato de condroitina C	1
10	Clon específico de 24-40 aa del mAb biotinilado	5,5 mg/l
	Clon del mAb 19C7 biotinilado	3 mg/l
	pH	6,6

15 Los anticuerpos monoclonales están comercialmente disponibles. HyTest, Ltd (Itainen Pitkakatu 4C, Pharma City, Torku, Finlandia, 20520) es un proveedor del clon 19C7 de anticuerpo monoclonal de ratón, específico para la región de troponina I que comprende los aminoácidos 41-49. Este mAb se biotinila como se proporciona a continuación. HyTest también es un proveedor del clon 16A11 de anticuerpo monoclonal de ratón, específico para la región de troponina I que comprende los aminoácidos 87-91. Este mAb se marca con HRP como se proporciona a continuación. Strategic BioSolutions (111 Pencader Dr., Newark, Delaware, USA 19702) es un proveedor de un clon de anticuerpo monoclonal de ratón específico para la región de troponina I que comprende los aminoácidos 24-40. Este mAb se biotinila como a continuación.

20 El procedimiento de biotinilación implica lo siguiente: el clon 19C7 y el clon dirigido a 24-40 de Strategic BioSolutions se conjugan individualmente con biotina usando química específica de regiones muy conocida.

25 El procedimiento de marcado de HRP implica lo siguiente: el clon 16A11 de HyTest se conjuga con HRP usando la siguiente metodología: 1) El mAb se activa con grupos maleimida haciéndolo reaccionar con sulfo-SMCC [4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo]; 2) El HRP se activa con grupos tiol haciéndolo reaccionar con NHS-SATA [N-hidroxisuccinimida de ácido s-acetiltioacético]; 3) Ambos reactivos activados se purifican y a continuación se hacen reaccionar juntos para producir 16A11-HRP, que a continuación se purifica.

30

REIVINDICACIONES

1. Un reactivo de inmunoensayo que comprende:
- 5 un agente de unión al analito en un diluyente; y sulfato de condroitina en una cantidad suficiente para reducir la unión no específica en un ensayo de una muestra para el analito, en el que el analito es troponina I, en el que el agente de unión al analito es un anticuerpo para el analito o un receptor para el analito.
- 10 2. El reactivo de inmunoensayo de la reivindicación 1, en el que el sulfato de condroitina está presente en una cantidad de 0,25 mg/ml a 4 mg/ml.
3. El reactivo de inmunoensayo de la reivindicación 1, en el que el sulfato de condroitina está presente en una cantidad de 1 mg/ml.
- 15 4. El reactivo de inmunoensayo de la reivindicación 1, en el que el agente de unión al analito es un anticuerpo.
5. Una composición de muestra que comprende:
- 20 una muestra que va a ensayarse para la presencia de un analito; y el reactivo de inmunoensayo de la reivindicación 1, en el que el analito es troponina I.
6. La composición de muestra de la reivindicación 5, en la que la muestra es una muestra de suero.
- 25 7. La composición de muestra de la reivindicación 5, en la que la muestra es una muestra de plasma que contiene ácido etilendiaminatetraacético.
8. La composición de muestra de la reivindicación 5, en la que el agente de unión al analito es un anticuerpo.
- 30 9. Un procedimiento de detección de un analito en una muestra, comprendiendo el procedimiento:
- 35 combinar una muestra que va a ensayarse para la presencia de un analito con el reactivo de inmunoensayo de la reivindicación 1 de manera que se forme un complejo de cualquier analito presente en la muestra y el agente de unión al analito; y detectar el complejo resultante de manera que se detecte el analito, en el que el analito es troponina I.

Fig. 1

	NEAT	Cond #1	Cond #2	Cond #3	Cond #4	Cond #5	Cond #6	Cond #7	Cond #8
		N-acetil-glucosamina	N-Acetil-Galactosamina	Glucosamina	ácido N-Acetil neuramínico	Condroitina Sulfato C	Quitina	Mucina	Manosa
	Pred. Conc.	Pred. Conc.	Pred. Conc.	Pred. Conc.	Pred. Conc.	Pred. Conc.	Pred. Conc.	Pred. Conc.	Pred. Conc.
NEG POOL	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
NEG POOL	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
POS POOL	4.63	4.18	4.08	3.96	3.70	3.54	3.61	3.57	3.58
POS POOL	4.64	4.19	3.94	3.99	3.67	3.55	3.67	3.60	3.61
TC0005	0.52	0.48	0.45	0.44	0.45	0.01	0.44	0.44	0.46
TC0005	0.58	0.54	0.45	0.48	0.40	0.02	0.40	0.37	0.44
58413	0.80	0.48	0.63	0.58	0.62	0.00	0.68	0.47	0.56
58413	0.83	0.62	0.62	0.60	0.61	0.00	0.64	0.47	0.56
58732	5.49	4.67	4.93	4.50	4.96	0.11	5.08	4.76	4.91
58732	4.64	4.98	4.07	4.20	4.50	0.10	4.51	4.37	4.16
58201	1.95	1.83	1.76	1.76	2.20	0.00	2.23	1.86	1.87
58201	2.01	2.19	2.05	1.95	2.09	0.00	1.87	1.98	1.63
5654	0.88	0.76	0.80	0.85	0.90	0.20	1.00	0.41	0.93
5654	0.88	1.01	0.81	0.84	0.82	0.20	0.83	0.43	0.85
5345	1.08	1.02	0.98	0.91	1.09	0.08	0.97	0.70	1.01
5345	1.10	1.10	0.96	1.00	0.91	0.08	0.96	0.50	0.92
52674	1.19	1.04	1.13	1.07	1.15	0.00	1.20	0.64	1.19
52674	1.11	1.49	1.03	0.98	0.99	0.01	1.13	0.64	1.12
5686	1.10	1.11	1.15	1.06	1.07	0.00	1.14	0.60	1.24
5686	1.18	1.24	1.13	1.08	1.02	0.00	1.23	0.63	1.06

Fig. 2

	Condition 1		Condition 2		Condition 3		Condition 4		Condition 5		Condition 6		Condition 7	
	AU	Tred (mg/ml)	AU	Tred (mg/ml)	AU	Tred (mg/ml)	AU	Tred (mg/ml)	AU	Tred (mg/ml)	AU	Tred (mg/ml)	AU	Tred (mg/ml)
MS1	2315	0.52	2339	0.57	2380	0.59	2725	0.51	2782	0.55	2083	0.57	2367	0.52
MS2	110300	7.28	108622	7.71	98641	8.08	109737	7.44	100192	7.34	92234	7.84	118284	7.31
MS3	188847	11.17	193847	12.16	118284	9.29	194708	11.65	188202	11.38	188857	12.34	203761	11.10
Nagipod	152	0.00	121	0.00	147	0.00	144	0.00	153	0.00	132	0.00	170	0.00
Resid	39224	3.13	39495	3.33	34808	3.68	39254	3.37	39103	3.47	39160	3.80	39260	2.95
T0005	468	0.11	414	0.12	408	0.13	320	0.07	312	0.07	282	0.05	874	0.21
5843	155	0.02	201	0.03	192	0.02	223	0.03	189	0.02	166	-0.02	1068	0.25
5873	872	0.21	591	0.18	438	0.15	1207	0.29	836	0.23	667	0.24	16328	1.88
58201	174	0.01	150	0.00	166	0.00	172	0.00	157	0.00	156	-0.03	5739	0.81
5854	1307	0.29	821	0.24	531	0.19	2873	0.80	2411	0.80	1060	0.35	5762	0.81
5845	714	0.17	643	0.19	474	0.16	710	0.18	708	0.20	551	0.19	6640	0.89
5886	471	0.11	534	0.16	295	0.08	279	0.05	310	0.07	275	0.05	4965	0.73
5874	380	0.08	442	0.13	325	0.10	412	0.10	407	0.11	369	0.11	2474	0.46
CS	1mg/ml	1mg/ml	2mg/ml	2mg/ml	4mg/ml	4mg/ml	1mg/ml	1mg/ml	2mg/ml	2mg/ml	4mg/ml	4mg/ml	0mg/ml	0mg/ml
EDIA	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-

Fig. 3

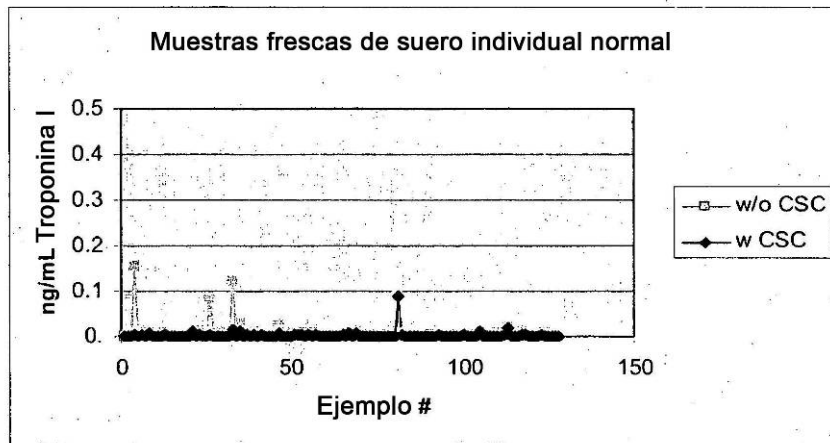


Fig. 4

CONC.	Kit Lot			PredConc
	CS-A	CS-B	CS-C	
7003	0.002	0.002	0.004	0.000
7009	0.005	0.005	0.004	0.338
7011	0.005	0.003	0.005	0.000
7015	0.012	0.011	0.010	0.000
7027	0.007	0.006	0.008	0.002
7029	0.006	0.004	0.005	0.095
7036	0.006	0.007	0.005	0.000
7041	0.005	0.005	0.004	0.000
7047	0.005	0.006	0.005	0.004
7063	0.004	0.005	0.004	0.704
7065	0.026	0.024	0.024	0.113
7066	0.005	0.004	0.005	0.177
7076	0.013	0.012	0.014	0.117
7084	0.007	0.005	0.006	0.383
7086	0.006	0.005	0.004	0.083
7115	0.036	0.036	0.032	0.175
7116	0.010	0.008	0.009	0.090
7134	0.007	0.005	0.006	0.238
7180	0.007	0.007	0.006	0.123
7193	0.006	0.005	0.007	0.084

Fig. 5

