

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 781**

51 Int. Cl.:

G01N 33/573 (2006.01)

G01N 21/82 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/545 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2015 PCT/JP2015/061350**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2015 WO15166790**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2015 E 15785419 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 3139168**

54 Título: **Método para ensayar la isozima MB de la creatina quinasa y kit para usarse en el mismo**

30 Prioridad:

30.04.2014 JP 2014093351

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.04.2019

73 Titular/es:

**FUJIFILM WAKO PURE CHEMICAL
CORPORATION (100.0%)
1-2, Doshomachi 3-chome, Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 540-8605, JP**

72 Inventor/es:

**HANAI, KAZUMA;
ODAGAKI, SHINICHI y
MASUDA, TSUTOMU**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 708 781 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

Método para ensayar la isozima MB de la creatina quinasa y kit para usarse en el mismo

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método para medir la isozima MB de la creatina quinasa y a un kit para ser usado en el mismo.

Técnica anterior

La creatina quinasa (abreviada de aquí en adelante en la presente memoria como CK) es una enzima contenida en el músculo esquelético, músculo cardíaco, músculo liso, cerebro o semejantes, y ejerce un papel importante en relación con el metabolismo energético de una célula.

10 La CK es una proteína dimérica compuesta por dos subunidades, y la subunidad tiene dos clases: tipo M (tipo muscular, M) y tipo B (tipo cerebral, B). Además, mediante la combinación de las subunidades, existen tres clases de isozimas de CK; CK-MM que es abundante en el músculo esquelético, CK-MB que es abundante en el músculo cardíaco, y CK-BB que es abundante en el cerebro. Entre ellas, CK-MB tiene una alta especificidad para el músculo cardíaco, y se libera de las células del músculo del corazón y fluye en la sangre, cuando se produce daño miocárdico. Por lo tanto, CK-MB es un ítem importante en el examen clínico como un marcador de daño miocárdico (infarto de miocardio).

15 Como una medida cuantitativa de CK-MB, se conoce un método de inhibición inmunológico para medir la "actividad enzimática", una turbidimetría látex para medir la "cantidad de proteína", un método de inmunoensayo electroquímico con luminiscencia o semejantes, y también se ha mostrado "un método electroforético" como técnica para analizar la isozima.

20 Entre estos métodos, el método de inhibición inmunológico se usa generalmente porque el método puede hacer la medición usando un analizador automatizado de uso general. Sin embargo, cuando CK-BB o semejantes está contenida en una muestra que se va a ensayar, también se mide en el método una actividad de la CK-BB o semejantes, y la especificidad para medir CK-MB en la muestra es entonces baja. Por lo tanto, el método tiene un problema ya que no puede obtenerse por el método un valor de medición correcta de CK-MB. El método de inmunoensayo electroquímico con luminiscencia es un método capaz de medir específicamente CK-MB sin estar influido por CK-BB, sin embargo, el método tiene problemas tales como el requerimiento de un equipo de medición especial, y los reactivos que se van a usar son costosos y semejantes. Además, el método electroforético no se utiliza para el propósito de la medición cuantitativa de CK-MB, debido a la falta de rapidez, cuantitativamente inferior y semejantes.

25 Por otra parte, la turbidimetría látex que mide una cantidad de proteína es un método para cuantificar CK-MB como una cantidad de proteína por un método inmunológico usando un anticuerpo monoclonal específico para CK-MB. Este método es capaz de llevar a cabo la medición usando un analizador automatizado de uso general, y tiene una mayor precisión comparado con el método de inhibición inmunológico que mide una actividad enzimática, y el método tiene una especificidad excelente para CK-MB, y así, se ha dicho que es un método capaz de monitorizar correctamente la cantidad de CK-MB liberada.

30 En la práctica, sin embargo, cuando se mide el valor de CK-MB de una muestra de ensayo en la que coexiste CK-BB por la turbidimetría látex convencional, también se midió CK-BB (riesgo de valor falso alto), y ha habido un caso en el que no se ha obtenido el valor de la medición correcta de CK-MB. Como una causa, se consideró que una parte del anticuerpo anti-CK-MB que se usó podría haberse unido (reaccionado de manera cruzada) también a CK-BB en la muestra.

35 De acuerdo con esto, para evitar este problema, se desarrolló un anticuerpo anti-CK-MB que no se une a CK-MM ni a CK-BB, y se ha propuesto la turbidimetría látex usando este (BIBLIOGRAFÍA DE PATENTES 1). Este método consiste en que un primer anticuerpo anti-CK-MB que tiene especificidad como se ha descrito anteriormente y el anticuerpo se inmoviliza en una partícula de látex, y un segundo anticuerpo anti-CK-MB que se une a un epítipo diferente del del primer anticuerpo anti-CK-MB inmovilizado en la partícula de látex y también tiene la especificidad descrita anteriormente se hacen reaccionar con CK-MB en una muestra para medir cualquier incremento en la agregación que resulta de la reacción antígeno-anticuerpo. En la práctica, sin embargo, incluso cuando se mide CK-MB por este método, hubo un caso en el que se obtuvo un valor falso alto.

40 Otro método de medición por la turbidimetría látex incluye un método usando partículas de látex que tienen inmovilizado un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a CK-MB acto seguido, y partículas de látex que tienen inmovilizado un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a CK-BB acto seguido (BIBLIOGRAFÍA DE PATENTES 2). Este método es el que pretende evitar la influencia de CK-BB en la medición de CK-MB mediante la regulación del tamaño de partícula de la partícula de látex. Incluso con este método, sin embargo, no fue posible evitar suficientemente una influencia de CK-BB en la medición de CK-MB.

55 **Lista de citas**

Bibliografía de patentes

BIBLIOGRAFÍA DE PATENTES 1: JP-B-2774875

BIBLIOGRAFÍA DE PATENTES 2: JP-A-2013-125005

Compendio de la invención

5 Problema técnico

Como se ha descrito anteriormente, en los métodos convencionales para medir CK-MB mediante la medición de la cantidad de proteína fue difícil medir específicamente CK-MB evitando una influencia de CK-BB. Como la causa, se supuso que como la especificidad del anticuerpo anti-CK-MB podría ser insuficiente, el anticuerpo anti-CK-MB reacciona de manera cruzada no solo con CK-MB sino también algo con CK-BB (surgimiento de un valor falso alto).

10 De acuerdo con esto, la presente invención se ha realizado a la vista de las circunstancias tales como se han descrito anteriormente, y un objeto es proporcionar un método para medir específicamente CK-MB evitando una influencia de CK-BB.

Solución al problema

15 La presente invención se ha realizado para el propósito de resolver los problemas descritos anteriormente, y comprende la siguiente composición.

(1) Un método para medir CK-MB en una muestra, en el orden según se reivindica, que comprende:

20 1) una etapa para hacer reaccionar la muestra con un primer anticuerpo frente a CK-MB, un segundo anticuerpo frente a CK-MB que reconoce un epítipo diferente del reconocido por el primer anticuerpo, y un anticuerpo anti-CK-B que reconoce una región del aminoácido 1 al 100 desde el extremo N de la secuencia de aminoácidos de la subunidad B de la creatina quinasa, en donde el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo reacciona no solo con CK-MB sino también con una isozima BB de la creatina quinasa (de aquí en adelante en la presente memoria abreviada como CK-BB) (etapa 1);

2) una etapa para medir un cambio óptico generado por la reacción (etapa 2); y

25 3) una etapa para determinar una cantidad de CK-MB en la muestra sobre la base del resultado obtenido en la etapa 2 (etapa 3).

(2) Un método para evitar una influencia de CK-BB en la medición de CK-MB con un primer anticuerpo frente a CK-MB y un segundo anticuerpo frente a CK-MB que reconoce un epítipo diferente del reconocido por el primer anticuerpo, en donde el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo reacciona no solo con CK-MB sino también con CK-BB, que comprende tratar una muestra con un anticuerpo anti-CK-B que reconoce una región del aminoácido 1 al 100 desde el extremo N de la secuencia de aminoácidos de la subunidad B de CK.

(3) Un kit para medir CK-MB que comprende un primer anticuerpo frente a CK-MB, un segundo anticuerpo frente a CK-MB que reconoce un epítipo diferente del reconocido por el primer anticuerpo, en donde el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo reacciona no solo con CK-MB sino también con CK-BB, y un anticuerpo anti-CK-B que reconoce una región del aminoácido 1 al 100 desde el extremo N de la secuencia de aminoácidos de la subunidad B de CK.

35 Los presentes inventores han encontrado que cuando un anticuerpo que reconoce una región específica de la subunidad B de CK (anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención) coexiste en el sistema de medición de CK-MB basado en el método convencional para medir la cantidad de proteína, la medición de CK-MB puede llevarse a cabo con alta precisión y alta sensibilidad evitando una influencia de CK-BB en la muestra, y ha completado así la presente invención.

40 **Efectos ventajosos de la invención**

Según la presente invención, puede evitarse (suprimirse) una influencia de CK-BB coexistente en la muestra en el valor de la medición (surgimiento de valor falso alto) en la medición de CK-MB; y la medición de CK-MB puede llevarse a cabo con una mayor precisión y con una mayor sensibilidad. Además, según el método de la presente invención, como la medición cuantitativa de la proteína CK-MB usa un analizador automatizado de uso general, no es necesario el uso de equipo especial.

Además, el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención es el que evita una influencia de CK-BB en la medición de CK-MB. De acuerdo con esto, la presente invención proporciona un método para evitar una influencia de CK-BB en el momento de la medición de CK-MB.

Breve descripción de los dibujos

50 La Fig. 1 muestra un patrón electroforético obtenido usando MAb frente a CK-BB (producido por Meridian Life Science,

Inc.) como el anticuerpo anti-CK-B, en el Ejemplo 2.

La Fig. 2 muestra un patrón electroforético obtenido usando anticuerpo monoclonal CKBB (producido por Roche Diagnostics K.K.) como el anticuerpo anti-CK-B, en el Ejemplo 2.

Descripción de realizaciones

5 El método para medir CK-MB de la presente invención es "Un método para medir CK-MB en una muestra, que comprende:

(1) una etapa para hacer reaccionar la muestra con un primer anticuerpo frente a la isozima MB de la creatina quinasa (abreviada de aquí en adelante en la presente memoria como CK-MB), un segundo anticuerpo frente a CK-MB que reconoce un epítipo diferente del reconocido por el primer anticuerpo, en donde el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo reacciona no solo con CK-MB sino también con una isozima BB de la creatina quinasa (abreviada de aquí en adelante en la presente memoria como CK-BB), y un anticuerpo anti-CK-B que reconoce una región del aminoácido 1 al 100 desde el extremo N de la secuencia de aminoácidos de la subunidad B de la creatina quinasa (etapa 1);

(2) una etapa para medir un cambio óptico generado por la reacción (etapa 2); y

15 (3) una etapa para determinar una cantidad de CK-MB en la muestra sobre la base del resultado obtenido en la etapa 2 (etapa 3)."

Esto es, en el método de la presente invención, el anticuerpo anti-CK-B de la presente invención se añade a un método para medir CK-MB usando dos clases de anticuerpos anti-CK-MB, y de esta manera puede evitarse una influencia de CK-BB, y como resultado, CK-MB puede medirse específicamente.

20 En cuanto a un principio de medición de que puede evitarse una influencia de CK-BB por la presente invención, los presentes inventores han inferido lo siguiente.

La CK-MB es un heterodímero de una subunidad M y una subunidad B. La CK-BB es un homodímero de la subunidad B.

25 En el caso en el que CK-MB y CK-BB coexistan en la muestra, cuando la muestra se pone en contacto con el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención, el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención se une a la subunidad B de CK-MB y también a la subunidad B de CK-BB en la muestra. De acuerdo con esto, es concebible que el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención, que está unido a la subunidad B de CK-BB, inhiba la unión del primer anticuerpo o del segundo anticuerpo con CK-BB. En consecuencia, se considera que en el método para medir CK-MB implicado en la presente invención, se evita una influencia de CK-BB presente en la muestra, y CK-MB puede medirse específicamente y con alta precisión.

30 El primer anticuerpo frente a CK-MB implicado en la presente invención (de aquí en adelante en la presente memoria, puede abreviarse simplemente como "el primer anticuerpo") incluye un anticuerpo que reconoce tanto la subunidad M como la subunidad B de CK-MB.

35 El segundo anticuerpo frente a CK-MB implicado en la presente invención (de aquí en adelante en la presente memoria, puede abreviarse simplemente como "el segundo anticuerpo") incluye un anticuerpo que reconoce tanto la subunidad M como la subunidad B de CK-MB, pero reconoce un epítipo diferente del que reconoce el primer anticuerpo.

40 El anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención incluye un anticuerpo que reconoce una región del aminoácido 1 (esto es, aminoácido N-terminal) al 100 desde el extremo N de la secuencia de aminoácidos de la subunidad B de CK. Esto es, solo el anticuerpo anti-subunidad B, que reconoce la subunidad B de CK y reconoce una región específica en la región del aminoácido 1 al 100 desde el extremo N de la subunidad B, puede conseguir un efecto ventajoso de la presente invención.

Debe indicarse que, en cuanto al anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención, es más preferible el que reconoce una estructura tridimensional (conformación) de una región del aminoácido 1 al 100 desde el extremo N de la secuencia de aminoácidos de la subunidad B de CK nativa.

45 La secuencia de aminoácidos de la región del aminoácido 1 al 100 desde el extremo N de la secuencia de aminoácidos de la subunidad B de CK es específicamente una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1.

Debe indicarse que, la secuencia de aminoácidos completa de la subunidad B de CK se conoce públicamente (NCBI Secuencia de Referencia: NP_001814.2, SEQ ID NO: 2 en la presente descripción).

50 De aquí en adelante en la presente memoria, el primer anticuerpo implicado en la presente invención, el segundo anticuerpo implicado en la presente invención, y el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención pueden abreviarse colectivamente y simplemente como "el anticuerpo implicado en la presente invención".

Cada anticuerpo implicado en la presente invención puede ser uno cualquiera siempre que tenga cada propiedad como se ha descrito anteriormente, y puede ser un producto disponible comercialmente o los preparados apropiadamente por un método convencional, y cada uno puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal.

5 En el caso en el que el anticuerpo implicado en la presente invención sea un anticuerpo monoclonal, su origen no está especialmente limitado, y son usables todos de productos disponibles comercialmente o el producido por un método conocido *per se* que utiliza una técnica de fusión celular o técnica de recombinación génica o semejantes [Eur. J. immunol., 6, 511 (1976)], y aquellos que tienen propiedades tales como las descritas anteriormente.

10 En el caso en el que el anticuerpo implicado en la presente invención sea un anticuerpo policlonal, su origen no está especialmente limitado, e incluye, por ejemplo, los derivados de conejo, rata, ratón, oveja, cabra, caballo o semejantes, y que tienen propiedades tales como las descritas anteriormente. Pueden usarse productos disponibles comercialmente o aquellos obtenidos por el método descrito, por ejemplo, en "T. Matsushashi et. al., Introduction to Experimental Immunology, 2ª ed., 1981, Japan Scientific Society Press", y semejantes.

15 Además, en el anticuerpo implicado en la presente invención, también están incluidos el denominado fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab obtenido por la digestión parcial con papaína, fragmento F(ab')₂ obtenido por la digestión parcial con pepsina, y Fab' obtenido por tratamiento de reducción del F(ab')₂.

El anticuerpo implicado en la presente invención puede obtenerse por un método conocido *per se*, tal como se ha descrito anteriormente, pero también pueden usarse productos disponibles comercialmente.

20 En cuanto a los productos disponibles comercialmente del primer anticuerpo y el segundo anticuerpo, aquellos que reconocen diferentes epítomos uno del otro, se seleccionan y se usan de aquellos productos disponibles comercialmente como el anticuerpo anti-CK-MB, y no están especialmente limitados.

25 En cuanto al producto disponible comercialmente del anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención, el que reconoce la región del aminoácido 1 al 100 desde el extremo N de la secuencia de aminoácidos de la subunidad B de CK puede seleccionarse y usarse de los disponibles comercialmente como el anticuerpo anti-CK-B o el anticuerpo anti-CK-BB. Dicho producto disponible comercialmente incluye, por ejemplo, MAbs frente a CK-BB que está producido por Meridian Life Science, Inc., anticuerpo monoclonal CKBB que está producido por Roche Diagnostics K. K., anticuerpo monoclonal CK-BB que está producido por BiosPacific, Inc., anticuerpo CKBB que está producido por Fitzgerald I.I. y semejantes.

30 El primer anticuerpo y el segundo anticuerpo pueden inmovilizarse (soportarse) en un vehículo insoluble y usarse. Es conveniente usar un kit disponible comercialmente que contiene partícula de látex con el primer anticuerpo inmovilizado y partícula de látex con el segundo anticuerpo inmovilizado como reactivos constituyentes. Dicho kit disponible comercialmente incluye, por ejemplo, L-type WAKO CK-MB mass (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) o semejantes.

35 En el caso en el que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se usan mediante la inmovilización en el vehículo insoluble, como el vehículo insoluble que se va a usar, puede usarse cualquiera siempre que sea el vehículo usado habitualmente en este campo, e incluye como el vehículo insoluble preferible el preparado a partir de un material tal como un compuesto polimérico sintético tal como poliestireno, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, poliacrilamida, metacrilato poliglicidilo, polipropileno, cloruro de polivinilo, polietileno, policlorocarbonato, una resina de silicona, y goma de silicona; sustancias inorgánicas tales como vidrio poroso, vidrio esmerilado, alúmina, gel de sílice, carbón activado, y óxido metálico. Además, esos vehículos pueden usarse en varias formas tales como partícula de látex, lecho, tubo, chip de tipo disco, y micropartícula.

45 Entre los vehículos insolubles descritos anteriormente, la partícula de látex es particularmente preferible desde el punto de vista de que la modificación química de la superficie del vehículo según un propósito es fácil ya que es un vehículo artificial, y es difícil que tenga lugar una reacción no específica, etc. El material de este no está especialmente limitado siempre que se use habitualmente en este campo, e incluye, por ejemplo, partícula de látex de tipo estireno tal como partícula de látex de poliestireno, partículas de látex de tipo ácido acrílico y semejantes como las preferibles. Debe indicarse que, entre estas partículas de látex, la partícula de látex de poliestireno preparada por polimerización por emulsión sin usar un agente emulsionante es particularmente preferible, porque tiene la propiedad de adsorber sin problemas proteínas o péptidos debido a tener una fuerte hidrofobicidad en la superficie, y dispersarse de forma estable en una disolución incluso en ausencia del agente emulsionante basado en la repulsión de cargas negativas ellas mismas en la superficie. Además, también pueden usarse varias partículas de látex modificadas (por ejemplo, una partícula de látex modificada con ácido carboxílico producida introduciendo un grupo carboxilo en el poliestireno descrito anteriormente), partícula de látex magnética (una partícula de látex encapsulada en una partícula magnética) y semejantes.

55 Los materiales de la partícula de látex que se va a usar para inmovilizar el primer anticuerpo y la partícula de látex que se va a usar para inmovilizar el segundo anticuerpo pueden ser iguales o cada uno diferente, siempre que sean aquellos como se ha descrito anteriormente.

Además, en cuanto a la partícula de látex implicada en la presente invención, pueden usarse las disponibles comercialmente, y son preferibles aquellas que tienen una gran área superficial por unidad de peso, porque un anticuerpo puede soportarse eficientemente. Específicamente, el diámetro de partícula promedio es habitualmente 0.05 a 2.4 μm , preferiblemente 0.05 a 1.0 μm , y aún más preferiblemente 0.05 a 0.50 μm .

5 La partícula de látex para inmovilizar el primer anticuerpo y la partícula de látex para inmovilizar el segundo anticuerpo pueden tener el mismo tamaño de partícula, o pueden usarse en combinación aquellas que tienen diferente tamaño de partícula promedio del intervalo descrito anteriormente.

Además, las partículas de látex usadas para inmovilizar el primer anticuerpo pueden ser aquellas que tienen el mismo tamaño de partícula o diferente. Las partículas de látex usadas para inmovilizar el segundo anticuerpo también pueden ser aquellas que tienen el mismo tamaño de partícula o diferente.

10 La inmovilización del primer anticuerpo y el segundo anticuerpo en el vehículo insoluble puede llevarse a cabo poniendo en contacto cada anticuerpo con el vehículo insoluble, y un método de inmovilización conocido per se, por ejemplo, puede usarse un método para la inmovilización por anclaje covalente, un método para la inmovilización por adsorción física o semejantes.

15 La cantidad del primer anticuerpo que se va a soportar en el vehículo insoluble, y la cantidad del segundo anticuerpo que se va a soportar en el vehículo insoluble son diferentes dependiendo del vehículo, y se prepara para proporcionar habitualmente 0.5 a 2000 mgAb, y preferiblemente 2 a 500 mgAb, respecto a 1 g del vehículo. En el caso en el que el vehículo sea una partícula de látex, es habitualmente 0.5 a 2000 mgAb, y preferiblemente 2 a 500 mgAb, respecto a 1 g de las partículas de látex.

20 El vehículo insoluble en el que está inmovilizado el primer anticuerpo y el vehículo insoluble en el que está inmovilizado el segundo anticuerpo puede ser uno en el que solo está inmovilizado el primer anticuerpo y uno en el que solo está inmovilizado el segundo anticuerpo. O puede ser uno en el que tanto el primer anticuerpo como el segundo anticuerpo están inmovilizados en el mismo vehículo insoluble.

25 En la presente invención, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo pueden usarse como el unido al vehículo insoluble. Sin embargo, el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención no se usa como el unido al vehículo insoluble. Por ejemplo, cuando el método para medir CK-MB de la presente invención se lleva a cabo usando la partícula de látex como el vehículo insoluble, se formará una estructura entrecruzada entre CK-MB en una muestra, el primer anticuerpo inmovilizado en el látex y el segundo anticuerpo inmovilizado en el látex, y de esta manera se produce un cambio óptico. Sin embargo, aunque el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención se une a la subunidad B de CK-MB en la muestra, no está implicado en la formación de la estructura entrecruzada.

30 La etapa 1 del método para medir CK-MB de la presente invención es una etapa para hacer reaccionar la muestra que contiene CK-MB con el primer anticuerpo, el segundo anticuerpo, y el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención.

35 En la etapa 1, es suficiente para una disolución obtenida eventualmente que contiene la muestra, el primer anticuerpo, el segundo anticuerpo y el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención, sin embargo, es preferible que el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención se añada antes de que la muestra se ponga en contacto y reaccione con al menos uno del primer anticuerpo y segundo anticuerpo. En otras palabras, es preferible que la muestra se ponga en contacto con el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención previamente, y después se ponga en contacto con el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo.

40 En la etapa 1, en muchos casos, el primer anticuerpo, el segundo anticuerpo y el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención se usan en forma de disolución suspendiéndolos en una disolución de tampón o semejante. La disolución de tampón que se va a usar para preparar dicha disolución de reactivo no está especialmente limitada, siempre que sea la que se usa habitualmente en este campo, e incluye la que tiene acción tamponadora a un valor cercano a la neutralidad que tiene un pH de habitualmente 5.0 a 10.0, y preferiblemente 6.5 a 8.5. Específicamente, incluye, por ejemplo, una disolución de tampón HEPES, una disolución de tampón de ácido bórico, una disolución de tampón Tris, una disolución de tampón de ácido fosfórico, una disolución de tampón Veronal, una disolución de tampón Good o semejantes. Además, la concentración de agente tamponador de dicha disolución de tampón se selecciona según sea apropiado de un intervalo de habitualmente 10 a 1000 mM, y preferiblemente 10 a 300 mM.

45 Además, en el caso de usar un kit disponible comercialmente tal como se ha descrito anteriormente que contiene la partícula de látex con el primer anticuerpo inmovilizado o la partícula de látex con el segundo anticuerpo inmovilizado como un reactivo constituyente, puede usarse una disolución tampón incluida en el kit.

50 Cuando la medición se lleva a cabo usando un primer reactivo que contiene el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención y un segundo reactivo que contiene el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo mediante un sistema de dos reactivos como se describirá después, el pH del primer reactivo es preferiblemente aproximadamente pH 6.0 a 8.0 en consideración de la estabilidad. Teniendo en consideración la estabilidad, el pH del segundo reactivo es preferiblemente aproximadamente 6.0 a 8.0 así como el primer reactivo.

5 Cuando una disolución de reactivos se prepara suspendiendo el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención en la disolución de tampón como se ha descrito anteriormente, la concentración del anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención en la disolución de reactivos puede tener un nivel que proporcione un intervalo de concentración objetivo cuando la muestra se mezcla con la disolución que contiene el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención. Por ejemplo, puede ser 0.1 a 200 µg de Ab/mL, preferiblemente 0.5 a 50 µg de Ab/mL, más preferiblemente 1 a 40 µg de Ab/mL, y además preferiblemente 1 a 20 µg de Ab/mL. Esto es, el límite inferior es 0.1 µg de Ab/mL, preferiblemente 0.5 µg de Ab/mL, y más preferiblemente 1 µg de Ab/mL. Además, el límite superior de la misma es 200 µg de Ab/mL, preferiblemente 50 µg de Ab/mL, más preferiblemente 40 µg de Ab/mL, y además preferiblemente 20 µg de Ab/mL.

10 Además, la concentración del primer anticuerpo y/o del segundo anticuerpo en la disolución de reactivos, donde el primer anticuerpo y/o el segundo anticuerpo se suspenden en la disolución de tampón como se ha descrito anteriormente, es diferente dependiendo de la concentración de CK-MB que se va a medir, y es habitualmente 0.4 a 4200 µg/mL, preferiblemente 2 a 4200 µg/mL, y más preferiblemente 2 a 420 µg/mL.

15 Además, el contenido de cada uno de los vehículos insolubles en la disolución de reactivos, donde el vehículo insoluble con el primer anticuerpo inmovilizado y el vehículo insoluble con el segundo anticuerpo inmovilizado se suspenden en la disolución de tampón como se ha descrito anteriormente, es diferente dependiendo del tipo de vehículo que se va a usar, y es habitualmente 0.001 a 10 % en p/v, y preferiblemente 0.005 a 5 % en p/v. Cuando el vehículo es la partícula de látex, es habitualmente 0.1 a 10 % en p/v, y preferiblemente 0.2 a 5 % en p/v.

20 Debe indicarse que, la disolución que contiene el anticuerpo implicado en la presente invención puede contener además un sensibilizador, un tensioactivo, un conservante (por ejemplo, azida de sodio, ácido salicílico, ácido benzoico o semejantes), un agente estabilizante (por ejemplo, albúmina, globulina, gelatina soluble en agua, azúcares o semejantes), un activador, un agente para evitar una influencia de sustancias coexistentes, o el usado en este campo que no inhiba la estabilidad del agente coexistente y no inhiba una reacción antígeno-anticuerpo. Además, los intervalos de concentración de estos reactivos y semejantes también pueden seleccionarse apropiadamente del intervalo de la concentración y semejantes usados comúnmente en el método de medición conocido per se.

25 En la etapa 1, cuando la muestra se pone en contacto/se hace reaccionar con el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención, la concentración del anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención en la disolución de reacción puede ser cualquier concentración que sea capaz de evitar una influencia de CK-BB en la medición de CK-MB mediante la supresión/evitación de la reacción del anticuerpo anti-CK-MB con CK-BB en la muestra. Por ejemplo, puede ser 0.1 a 200 µg de Ab/mL, preferiblemente 0.5 a 50 µg de Ab/mL, más preferiblemente 1 a 40 µg de Ab/mL, y además preferiblemente 1 a 20 µg de Ab/mL. Esto es, el límite inferior es 0.1 µg de Ab/mL, preferiblemente 0.5 µg de Ab/mL, y más preferiblemente 1 µg de Ab/mL. Además, el límite superior de la misma es 200 µg de Ab/mL, preferiblemente 50 µg de Ab/mL, más preferiblemente 40 µg de Ab/mL, y además preferiblemente 20 µg de Ab/mL.

30 Cuando la muestra se pone en contacto/se hace reaccionar con el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo en la etapa 1, la concentración del primer anticuerpo y del segundo anticuerpo en la disolución de reacción al comienzo de la reacción puede ser diferente dependiendo de la concentración de CK-MB en la muestra, y no está especialmente limitada, y es habitualmente 0.1 a 1000 µg de Ab /mL, preferiblemente 0.5 a 1000 µg de Ab/mL, y más preferiblemente 0.5 a 100 µg de Ab/mL.

35 Además, en el caso de usar la partícula de látex como el vehículo insoluble, y en el momento en el que la muestra se pone en contacto/se hace reaccionar con el látex con el primer anticuerpo inmovilizado y el látex con el segundo anticuerpo en la etapa 1, la concentración del látex en la disolución de reacción es 0.01 a 3 % en p/v, y preferiblemente 0.01 a 1.2 % en p/v.

40 Además, el pH en el momento de la reacción del anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo no está especialmente limitado, siempre que esté en un intervalo que no suprima la reacción antígeno-anticuerpo, e incluye un intervalo de habitualmente pH 6.0 a 10.0, y preferiblemente 6.0 a 8.0. La temperatura en el momento de la reacción tampoco está especialmente limitada, siempre que esté en un intervalo que no suprima la reacción antígeno-anticuerpo, e incluye un intervalo de habitualmente 10 a 50 °C, y preferiblemente 20 a 40 °C. Como el tiempo de reacción de la misma es diferente dependiendo del anticuerpo implicado en la presente invención que se va a usar y las condiciones de la reacción tales como pH y temperatura, pueden someterse a una reacción durante aproximadamente 1 a 60 minutos, y preferiblemente durante aproximadamente 1 a 15 minutos dependiendo de cada condición de la reacción.

Los métodos específicos de la etapa 1 incluyen, por ejemplo, los descritos a continuación.

55 (i) Un método en el que se preparan una disolución que contiene el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención, y una disolución que contiene el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo, y se mezclan con una muestra en el orden de la disolución que contiene el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención, y después la disolución que contiene el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo (sistema de dos reactivos);

(ii) Un método en el que se preparan una disolución que contiene el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención, una disolución que contiene el primer anticuerpo, y una disolución que contiene el segundo anticuerpo, y

después una muestra se mezcla con la disolución que contiene el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención, la disolución que contiene el primer anticuerpo, y la disolución que contiene el segundo anticuerpo se mezclan con esta en orden (el orden en el que la disolución que contiene el primer anticuerpo y la disolución que contiene el segundo anticuerpo se añaden no está predeterminado, y pueden añadirse en cualquier orden); y

- 5 (iii) Un método en el que se prepara una disolución que contiene el primer anticuerpo, el segundo anticuerpo, y anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención, y estos componentes se hacen reaccionar a la vez mezclando la disolución con la muestra.

10 Entre estos métodos descritos anteriormente, el método (i), esto es, un método en el que se hace reaccionar la muestra que contiene CK-MB con el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención, y después se hace reaccionar con el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo es preferible, en consideración del caso en el que la medición se lleva a cabo usando un analizador automatizado, y la eficiencia del trabajo de la medición, etc.

Debe indicarse que, una disolución de pretratamiento para una muestra tal como un agente que evite una influencia de materiales coexistentes en la muestra puede ponerse en contacto con la muestra antes de que la muestra se ponga en contacto con el anticuerpo implicado en la presente invención.

15 Además, en uno cualquiera de los reactivos que constituyen un kit disponible comercialmente para medir CK-MB usando el anticuerpo anti-CK-MB que se usa habitualmente en el campo del Examen Clínico, el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención puede estar presente y usarse, de manera que se consiga cualquiera de los estados descritos anteriormente.

20 La etapa 2 del método para medir CK-MB de la presente invención es una etapa para medir un cambio óptico generado por la reacción de la etapa 1.

En esta etapa 2, la medición del cambio óptico generado por la reacción puede llevarse a cabo según el método de medición usando el anticuerpo anti-CK-MB conocido per se.

El cambio óptico incluye cambio en absorbancia, cambio en turbidez, cambio en la intensidad de la luz dispersada o semejantes.

25 La medición del cambio óptico significa medir el cambio óptico que se produce como consecuencia de la agregación inmune, e incluye específicamente, un método de aglutinación inmune tal como una inmunoturbidimetría, y una nefelometría inmunológica. Estos métodos de medición pueden llevarse a cabo según un método conocido per se. Por ejemplo, en el caso de usar la inmunoturbidimetría, puede llevarse a cabo según el método descrito en "Outline of Clinical Examination Methods", 30ª ed., Kanehara & Co., Ltd., p. 853-854" o semejantes; y en el caso de usar la nefelometría inmunológica, puede llevarse a cabo según el método descrito en "Outline of Clinical Examination Methods", 30ª ed., Kanehara & Co., Ltd., p. 851-853" o semejantes.

30 Entre ellos, es preferible la medición por la inmunoturbidimetría, y particularmente es preferible la turbidimetría látex usando la partícula de látex desde el punto de vista de que tiene una alta sensibilidad en la medición; puede medirse usando un analizador automatizado de uso general; es conveniente; y es capaz de tener además efectos ventajosos de la presente invención.

En el caso en el que el método de medición de la presente invención se lleve a cabo según la turbidimetría látex, puede llevarse a cabo según las condiciones de medición (por ejemplo, longitud de onda de la medición y semejantes) y la operación de la medición del método para medir CK-MB por la turbidimetría látex conocido per se, excepto en que el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención se pone en contacto y se mezcla con una muestra.

40 En el caso en el que la medición de CK-MB se lleve a cabo por la turbidimetría látex, la longitud de onda para la medición de la absorbancia es habitualmente 340 a 880 nm, y preferiblemente 540 a 800 nm. En el caso en el que la medición se lleve a cabo por dos longitudes de onda, puede medirse con una longitud de onda principal a aproximadamente 540 nm, y una sublongitud de onda a aproximadamente 800 nm.

El cambio óptico implicado en la presente invención puede determinarse, por ejemplo, como sigue:

45 (1) Después de empezar la reacción del vehículo insoluble con el primer anticuerpo inmovilizado y el vehículo insoluble con el segundo anticuerpo inmovilizado con CK-MB, la medición óptica de la disolución de reacción se lleva a cabo dos veces al intervalo apropiado, y la diferencia de los dos valores de la medición se define como cambio óptico (método del punto final).

50 (2) La tasa de cambio óptico (particularmente, la tasa de cambio máximo del mismo) de la disolución de reacción después de empezar la reacción del vehículo insoluble con el primer anticuerpo inmovilizado y el vehículo insoluble con el segundo anticuerpo inmovilizado con CK-MB se define como el cambio en la absorbancia (método diferencial).

La medición del cambio en la absorbancia, cambio en la turbidez o cambio en la intensidad de la luz dispersada puede llevarse a cabo manualmente, como parte de la rutina. Adicionalmente, como el método de la presente invención es aplicable a un sistema de medición usando un analizador automatizado, la medición puede llevarse a cabo usando un

equipo bioquímico tal como un analizador automatizado, y un espectrofotómetro, y una máquina nefelométrica especializada tal como un nefelómetro láser. La operación detallada puede llevarse a cabo según el manual de cada dispositivo.

5 Las combinaciones de reactivos en el caso de llevar a cabo la medición manualmente o usando un analizador automatizado no están especialmente limitadas, y pueden determinarse apropiadamente según el entorno del analizador automatizado que se va a aplicar, otros factores y semejantes.

10 En el caso en el que la etapa 2 del método para medir CK-MB implicado en la presente invención se lleve a cabo usando, por ejemplo, un kit disponible comercialmente que utiliza un método para medir CK-MB por la turbidimetría látex y un analizador automatizado de uso general, el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención puede estar contenido en uno cualquiera de los reactivos constituyentes del kit. Además, la medición común de CK-MB usando el analizador automatizado puede llevarse a cabo según el manual de instrucciones incluido en el kit, excepto que el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención se pone en contacto o se hace reaccionar con la muestra simultáneamente o antes de ponerla en contacto con otros anticuerpos.

15 La etapa 3 del método para medir CK-MB de la presente invención es "una etapa para determinar una cantidad de CK-MB sobre la base del resultado obtenido en la etapa 2".

Por ejemplo, la cantidad de CK-MB en la muestra puede calcularse aplicando la cantidad de cambio óptico medida en la etapa 2 a una curva de calibración que muestra la relación entre la concentración de CK-MB y la cantidad de cambio óptico que se preparó, por ejemplo, llevando a cabo el mismo método de medición usando disoluciones estándar con concentraciones conocidas de CK-MB como muestras previamente.

20 Como un ejemplo del método para medir CK-MB de la presente invención (etapa 1 a etapa 3), el caso en el que el método descrito anteriormente (i) (un método en el que se preparan una disolución que contiene el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención y una disolución que contiene el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo, y después estas disoluciones se mezclan con una muestra en el orden de la disolución que contiene el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención, y después la disolución que contiene el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo), llevando a cabo la medición por inmunoturbidimetría usando la partícula de látex se explicará específicamente como sigue.

25 En primer lugar, por ejemplo, una muestra en la que se va a medir CK-MB tal como sangre, suero y plasma se pone en contacto y se mezcla con el primer reactivo que contiene 0.1 a 200 µg de Ab/mL del anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención, y se hace reaccionar habitualmente a 10 a 50 °C, preferiblemente a 20 a 40 °C, durante habitualmente 1 a 60 minutos, preferiblemente durante 1 a 15 minutos, y más preferiblemente durante aproximadamente 5 minutos. Después, la disolución de reacción se mezcla con el segundo reactivo que contiene el primer anticuerpo inmovilizado en la partícula de látex y el segundo anticuerpo inmovilizado en la partícula de látex, y se hace reaccionar habitualmente a 10 a 50 °C, preferiblemente a 20 a 40 °C, durante habitualmente 1 a 60 minutos, preferiblemente durante 1 a 15 minutos, y más preferiblemente durante aproximadamente 5 minutos. El cambio en la absorbancia resultante de la disolución de reacción generado por la reacción antígeno-anticuerpo se mide, por ejemplo, a una longitud de onda de medición de 340 a 880 nm, y preferiblemente 540 a 800 nm. Separadamente, la medición se lleva a cabo de la misma manera usando, por ejemplo, productos estándar de CK-MB de concentraciones conocidas como muestras para preparar una curva de calibración que muestra la relación entre la concentración de CK-MB y la absorbancia, previamente. Después, se determina la concentración de CK-MB aplicando los valores medidos obtenidos usando la muestra en la que se va a medir CK-MB a la curva de calibración para cuantificar de esta manera CK-MB en la muestra.

30 Un método para evitar una influencia de CK-BB en la medición de CK-MB de la presente invención incluye un método para tratar la muestra mediante la adición del anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención a la muestra que contiene CK-MB. Los ejemplos específicos de los reactivos y el método de tratamiento usados en esta ocasión incluyen los descritos anteriormente en el método para medir CK-MB en la muestra.

35 El kit para medir CK-MB de la presente invención puede ser uno cualquiera que comprenda los reactivos que contienen el primer anticuerpo, el segundo anticuerpo y el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención, como reactivos constituyentes. Una realización preferida, un ejemplo específico y la concentración o semejantes de cada constituyente es como se describe en la explicación descrita anteriormente respecto al método para medir CK-MB de la presente invención.

40 Además, los reactivos que contienen el primer anticuerpo, el segundo anticuerpo, o el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención pueden ser aquellos en un estado de disolución tal como una disolución suspendida del anticuerpo implicado en la presente invención, el vehículo insoluble con el primer anticuerpo inmovilizado, el vehículo insoluble con el segundo anticuerpo inmovilizado, el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención en una disolución tampón apropiada, o pueden ser productos congelados, o productos liofilizados de los mismos. Los ejemplos específicos de los agentes de tampón y semejantes que se van a usar para este propósito, el pH y la concentración de los mismos son como se ha descrito anteriormente.

45 Además, a los reactivos contenidos en estos kits se pueden añadir los reactivos usados habitualmente en este campo,

5 por ejemplo, un agente de tampón, un sensibilizante, un tensioactivo, un conservante (por ejemplo, azida de sodio, ácido salicílico, ácido benzoico o semejantes), un agente estabilizante (por ejemplo, albúmina, globulina, gelatina soluble en agua, azúcares o semejantes), un activador, un agente para evitar una influencia de sustancias coexistentes, o el usado en este campo, siempre que los reactivos no interfieran con la estabilidad del agente coexistente y no inhiban una reacción antígeno-anticuerpo. Además, los intervalos de concentración de estos reactivos y semejantes pueden seleccionarse apropiadamente de los intervalos de concentración y semejantes usados habitualmente en el método de medición conocido per se.

10 Además, en el caso en el que el kit esté compuesto por una pluralidad de disoluciones de reactivos, los reactivos necesarios para medir los componentes objetivo están contenidos en cada una de las disoluciones de reactivos. Estos reactivos pueden estar contenidos estando separados apropiadamente en una cualquiera de las disoluciones de reactivos, de manera que la reacción para medir los componentes objetivo empieza en el momento en el que se mezcla cada una de las disoluciones de reactivos. La concentración de los reactivos que constituyen estas disoluciones de reactivos puede seleccionarse apropiadamente de un intervalo usado comúnmente en este campo.

15 Además, puede combinarse en el kit un producto estándar de CK-MB para preparar una curva de calibración que se va a usar para medir CK-MB. Como el estándar, también puede usarse un producto estándar disponible comercialmente, o el producido según un método conocido públicamente.

20 Además, en el kit de la presente invención, puede incluirse un manual etc. para uso en el método para medir CK-MB. El "manual" significa el manual de instrucción, el prospecto, o folleto (hoja), etc. del kit, en el que se describen sustancialmente características, principios, procedimientos operativos, y procedimientos de determinación, etc. del método en forma de texto o por figuras y tablas.

Las realizaciones específicas del kit de la presente invención incluyen, por ejemplo, la siguiente constitución:

(1) el que está constituido por el primer reactivo que contiene el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención, y un segundo reactivo que contiene el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo,

25 (2) el que está constituido por el primer reactivo que contiene el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención, el segundo reactivo que contiene el primer anticuerpo, y un tercer reactivo que contiene el segundo anticuerpo, o

(3) el que está constituido por un reactivo que contiene el primer anticuerpo, el segundo anticuerpo y el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención.

30 La muestra implicada en la presente invención puede ser una cualquiera que contenga CK-MB, e incluye específicamente fluido corporal, por ejemplo, sangre, plasma, suero, fluido sinovial, fluido pleural, fluido linfático, fluido espinal o semejantes, y orina, heces, saliva o semejantes, y entre ellos, se incluye como preferible suero, plasma o semejantes.

De aquí en adelante en la presente memoria, la presente invención se explicará más específicamente en referencia a los Ejemplos, pero la presente invención no debe estar limitada de ninguna manera por estos Ejemplos.

35 **Ejemplos**

Ejemplo 1

La medición se llevó a cabo usando L-type Wako CK-MB mass (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) que es un kit disponible comercialmente para medir CK-MB, y según la descripción en un documento adjunto del kit, como sigue.

40 El kit descrito anteriormente es el que se va a usar en el método para medir CK-MB por la turbidimetría látex usando los dos tipos de partículas de látex, en el que dos tipos de anticuerpos anti-CK-MB que tienen un diferente determinante antigénico se inmovilizaron en cada partícula de látex.

(1) Preparación la muestra de CK-BB

45 Se añadió CK-BB purificada derivada de cerebro humano (Meridian Life Science, Inc.) a suero humano de manera que se obtuvieron 400 ng/mL o 2000 ng/mL, y se usaron como las muestras de CK-BB.

(2) Preparación del primer reactivo

50 Como un anticuerpo anti-CK-B, MAb frente a CK-BB (Meridian Life Science, made Inc.) o anticuerpo monoclonal CKBB (producido por Roche Diagnostics Co., Ltd.), que era anticuerpo monoclonal anti-CK-BB de ratón disponible comercialmente, se añadió a una disolución de tampón incluida en el kit para preparar disoluciones de tampón que contenían anticuerpo (los primeros reactivos) teniendo cada una la concentración de 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, y 160 µg/mL.

Debe indicarse que, cuando la muestra de CK-BB y el primer reactivo se mezclan, cada una de la concentración del anticuerpo anti-CK-B en cada una de las disoluciones de reacción son 0, 1.2, 2.3, 4.9, 9.4, 18.8, 37.5, 75, 150 µg/mL, respectivamente.

(3) Segundo reactivo

5 La disolución de reactivo de látex incluida en el kit se usó como el segundo reactivo. La disolución de reactivo de látex contiene dos tipos de partículas de látex, donde dos tipos de anticuerpos anti-CK-MB que tienen diferente epítipo de reconocimiento se inmovilizaron en cada partícula de látex.

(4) Medición de CK-MB (método de 2 puntos finales)

10 Usando el autoanizador Hitachi 7170 (fabricado por Hitachi High-Technologies Corp.), se llevó a cabo la siguiente medición.

Esto es, se mezclaron 150 µL del primer reactivo preparado en (2) descrito anteriormente con 10 µL de una muestra de CK-BB preparada en (1) descrito anteriormente, y después de incubar a 37 °C durante 5 minutos, se añadieron 50 µL del segundo reactivo, y se incubó durante 5 minutos más. Se midió el cambio en la absorbancia a 660 nm de 30 segundos a 5 minutos después de añadir el segundo reactivo.

15 Como un control, se midió CK-MB en la misma muestra usando el mismo reactivo y el mismo instrumento de medición por el mismo método, excepto en que se usó una disolución de tampón que no contenía el anticuerpo anti-CK-B como el primer reactivo.

(5) Resultados

20 Los resultados obtenidos en el caso de usar el primer reactivo que contenía MAb frente a CK-BB como el anticuerpo anti-CK-B se muestran en la Tabla 1.

La Tabla 1 muestra el valor de medición obtenido llevando a cabo la medición de CK-MB usando la muestra de CK-BB que contenía 400 ng/mL o 2000 ng/mL de CK-BB (valor de medición de CK-MB), y la relación del valor de la medición de CK-MB obtenido llevando a cabo la medición de CK-MB usando la muestra de CK-BB respecto a la concentración de CK-BB en la muestra de CK-BB usada para la medición (tasa de cruzamiento con CK-BB).

25 Tabla 1

Concentración de anticuerpo anti-CK-B en el primer reactivo (µg/mL)	0	1.25	2.5	5	10	20	40	80	160
Valor de medición de CK-MB (ng/mL)									
400ng/mL (CK-BB)	18.6	9.7	5.2	3.2	2.4	2.2	1.9	2.1	1.9
2000ng/mL (CK-BB)	105.2	62.3	32.1	15.4	10.3	5.4	3.2	2.2	1.7
Tasa de cruzamiento con CK-BB									
400ng/mL (CK-BB)	4.6 %	2.4 %	1.3 %	0.8 %	0.6 %	0.5 %	0.5 %	0.5 %	0.5 %
2000ng/mL (CK-BB)	5.3 %	3.1 %	1.6 %	0.8 %	0.5 %	0.3 %	0.2 %	0.1 %	0.1 %

30 En el presente Ejemplo, se midió el valor de CK-MB en una muestra que no contenía CK-MB. Sin embargo, según la Tabla 1, por ejemplo, se obtuvo un valor de medición de 18.6 ng/mL cuando la medición de CK-MB se llevó a cabo usando la muestra que contenía 400 ng/mL de CK-BB y el primer reactivo que no contenía el anticuerpo anti-CK-B (MAb frente a CK-BB) (el caso en el que la concentración de adición del anticuerpo anti-CK-B es 0 µg/mL). Como esta muestra contiene 400 ng/mL de CK-BB, resulta que CK-BB también se ha medido a una tasa de cruzamiento de $18.6 \text{ (ng/mL)} / 400 \text{ (ng/mL)} \times 100 \approx$ aproximadamente 4.6 %, en esta medición (valor falso alto). De forma similar, cuando la medición de CK-MB se llevó a cabo usando la muestra que contenía 2000 ng/mL de CK-BB, y usando el primer reactivo que no contenía anticuerpo anti-CK-B (MAb frente a CK-BB), la tasa de cruzamiento fue 5.3 %.

35 Por el contrario, cuando la medición de CK-MB se llevó a cabo usando el primer reactivo que contenía anticuerpo anti-CK-B (MAb frente a CK-BB), la tasa de cruzamiento de CK-BB se redujo significativamente. Por ejemplo, cuando la medición de CK-MB se llevó a cabo usando el primer reactivo que contenía 5 µg/mL del anticuerpo anti-CK-B (MAb frente a CK-BB), la tasa de cruzamiento con CK-BB fue 0.8 % en ambos casos del uso de la muestra que contenía 400 ng/mL del mismo o la muestra que contenía 2000 ng/mL del mismo. Esto es, cuando la medición de CK-MB se

llevó a cabo usando el primer reactivo que contenía el anticuerpo anti-CK-B (MAb frente a CK-BB), una influencia de CK-BB sobre la medición de CK-MB pudo suprimirse significativamente, comparado con el caso de llevar a cabo la medición de CK-MB usando el primer reactivo que no contenía el anticuerpo anti-CK-B (MAb frente a CK-BB).

De forma similar, los resultados en el caso de usar el primer reactivo que contenía el anticuerpo monoclonal CKBB como el anticuerpo anti-CK-B se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Concentración de anticuerpo anti-CK-B en el primer reactivo ($\mu\text{g/mL}$)	0	1.25	2.5	5	10	20	40	80	160
Valor de medición de CK-MB (ng/mL)									
400ng/mL (CK-BB)	18.6	6.5	3.8	1.9	2.0	2.2	1.9	2.1	2.0
2000ng/mL (CK-BB)	105.2	51.5	20.8	8.5	6.5	4.2	3.0	1.5	1.4
Tasa de cruzamiento con CK-BB									
400ng/mL (CK-BB)	4.6 %	1.6 %	1.0 %	0.5 %	0.5 %	0.6 %	0.5 %	0.5 %	0.5 %
2000ng/mL (CK-BB)	5.3 %	2.6 %	1.0 %	0.4 %	0.3 %	0.2 %	0.2 %	0.1 %	0.1 %

Como está claro a partir de los resultados de la Tabla 2, en el caso en el que la medición de CK-MB se llevó a cabo usando el primer reactivo que contenía el anticuerpo anti-CK-B (anticuerpo monoclonal CKBB) también, una influencia de CK-BB pudo suprimirse significativamente, comparado con el caso de llevar a cabo la medición de CK-MB usando el primer reactivo que no contenía el anticuerpo anti-CK-B (anticuerpo monoclonal CKBB).

Como los resultados, se ha entendido que una influencia de CK-BB contenida en una muestra se evita mediante la adición del anticuerpo anti-CK-B (anticuerpo monoclonal CKBB) al sistema de medición de CK-MB convencional por turbidimetría látex, y puede llevarse a cabo la medición con alta especificidad para CK-MB.

Además, aunque no se mostraron los datos, se llevó a cabo una medición de CK-MB por el método similar como se ha descrito anteriormente, excepto por el uso del primer reactivo que contenía como un anticuerpo anti-CK-B el anticuerpo monoclonal CK-BB producido por BiosPacific, Inc. o el anticuerpo CKBB producido por Fitzgerald I. I. Como resultado, una influencia de CK-BB pudo evitarse significativamente, comparado con el caso de llevar a cabo una medición de CK-MB usando el primer reactivo que no contenía estos anticuerpos. De acuerdo con esto, se ha entendido que una influencia de CK-BB contenida en una muestra se evita, y la medición con alta especificidad para CK-MB puede llevarse a cabo añadiendo dicho anticuerpo CK-B (anticuerpo monoclonal CK-BB producido por BiosPacific, Inc. o anticuerpo CKBB producido por Fitzgerald I. I.) al sistema de medición de CK-MB convencional por turbidimetría látex.

Ejemplo 2

Como se ha confirmado a partir de los resultados del Ejemplo 1 que el uso del anticuerpo anti-CK-B (anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención) usado en el Ejemplo 1 podía evitar la influencia de CK-BB durante la medición de CK-MB por turbidimetría látex, un epítipo para estos anticuerpos se confirmó por el siguiente método.

(1) Transferencia Western

Se aplicaron 2 μL de 0.1 mg/mL de CK-BB purificada derivada de cerebro humano (Meridian Life Science, Inc.) a SuperSep™ (gel de electroforesis, producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.; gel de gradiente 5-20 %) para llevar a cabo electroforesis SDS-PAGE (a una corriente constante de 25 mA). Después, una fracción después de la electroforesis se transfirió a una membrana de PVDF por un método de transferencia semiseco.

Se disolvió Block Ace (producido por DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) en PBS-T (disolución salina tamponada con fosfato con Tween™ 20, pH 7.4, producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), de manera que se consiguió la concentración de 4 % en p/v para preparar una disolución de bloqueo. La membrana de PVDF descrita anteriormente

después de la transferencia se sumergió en esta disolución de bloqueo para llevar a cabo el tratamiento de bloqueo a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, la membrana de PVDF se cortó por cada carril de fracción, y cada uno de ellos se sumergió en la nueva disolución de bloqueo.

5 Después, como el anticuerpo anti-CK-B, se añadieron 4 tipos de anticuerpos policlonales anti-CK-BB de conejo disponibles comercialmente (todos producidos por Abcam plc) incluyendo cada uno un anticuerpo frente a (reconoce) un antígeno esto es 200aa-300aa (un resto del aminoácido 200 al 300 desde el extremo N en la secuencia de aminoácidos completa de la subunidad B de CK (SEQ ID NO: 1)), un anticuerpo frente a un antígeno esto es 350aa-
10 extremo C (un resto del aminoácido 350 al extremo C desde el extremo N), un anticuerpo frente a un antígeno esto es 165aa-357aa (un resto del aminoácido 165 al 357 desde el extremo N), y un anticuerpo frente a un antígeno esto es 1aa-100aa (un resto del aminoácido 1 al 100 desde el extremo N), a la disolución de bloqueo donde se sumergió la membrana de PVDF, y se trató a temperatura ambiente durante 2 horas.

15 Después de esto, el mismo anticuerpo anti-CK-B que el usado en el Ejemplo 1 (Mab frente a CK-BB o anticuerpo monoclonal CK-BB, esto es el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención), se añadió además a la disolución de bloqueo descrita anteriormente donde se sumergió la membrana, y se sumergió la membrana a 4 °C toda la noche. Después, la disolución de bloqueo se reemplazó con una cantidad suficiente de PBS-T, y la membrana se sumergió en el PBS-T durante 10 minutos, y después la membrana se lavó 3 veces por el método para reemplazar con PBS-T fresco. La membrana se sumergió en la disolución de bloqueo fresca, y después se añadieron
20 inmunoglobulinas policlonales anti-ratón de conejo/HRP (DAKO A/S) a la disolución de bloqueo y se sumergió a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, la membrana se lavó con una cantidad suficiente de PBS-T, y se emitió luz usando un reactivo de detección de transferencia Western ECL™ Prime (sustrato quimioluminiscente para peroxidasa, producido por GE Healthcare), y se detectó usando un LAS4000 (fabricado por FUJIFILM Corporation) durante un periodo de exposición de 10 segundos.

(2) Resultados

25 Los resultados obtenidos usando MAb frente a CK-BB como el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención se muestran en la Fig. 1, y los resultados obtenidos usando el anticuerpo monoclonal CK-BB como el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención se muestran en la Fig. 2, respectivamente.

En la Fig. 1 y Fig. 2, la posición de una fracción electroforética de CK-BB se indica por una marca de flecha.

Además, "sin adición" en la Fig. 1 y Fig. 2 muestra el caso en el que "no se llevó a cabo el pretratamiento de una fracción electroforética usando un anticuerpo anti-CK-B de conejo".

30 Además, por ejemplo, "200-300" muestra el resultado de "el caso en el que, después de que la fracción electroforética se hizo reaccionar con el anticuerpo anti-CK-B de conejo frente a un antígeno que es un resto del aminoácido 200 al 300 desde el extremo N de la subunidad B de CK previamente, se hizo reaccionar además con el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención [MAb frente a CK-BB (Fig. 1) o anticuerpo monoclonal CKBB (Fig. 2)]".

35 "350-C" muestra el resultado de "el caso en el que, después de que la fracción electroforética se hizo reaccionar con el anticuerpo anti-CK-B de conejo frente a un antígeno que es un resto del aminoácido 350 al extremo C desde el extremo N de la subunidad B de CK previamente, se hizo reaccionar además con el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención [MAb frente a CK-BB (Fig. 1) o anticuerpo monoclonal CKBB (Fig. 2)]".

40 "165-357" muestra el resultado de "el caso en el que, después de que la fracción electroforética se hizo reaccionar con el anticuerpo anti-CK-B de conejo frente a un antígeno que es un resto del aminoácido 165 al 357 desde el extremo N de la subunidad B de CK previamente, se hizo reaccionar además con el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención [MAb frente a CK-BB (Fig. 1) o anticuerpo monoclonal CKBB (Fig. 2)]".

45 "1-100" muestra el resultado de "el caso en el que, después de que la fracción electroforética se hizo reaccionar con el anticuerpo anti-CK-B de conejo frente a un antígeno que es un resto del aminoácido 1 al 100 desde el extremo N de la subunidad B de CK previamente, se hizo reaccionar además con el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención [MAb frente a CK-BB (Fig. 1) o anticuerpo monoclonal CKBB (Fig. 2)]".

50 Como está claro a partir de la Fig. 1 y Fig. 2, en el caso de "1-100", esto es, solo "en el caso en el que, después de que la fracción electroforética se hizo reaccionar con el anticuerpo anti-CK-B de conejo frente a un antígeno que es un resto del aminoácido 1 al 100 desde el extremo N de la subunidad B de CK previamente, se hizo reaccionar además con el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención [MAb frente a CK-BB (Fig. 1) o anticuerpo monoclonal CKBB (Fig. 2)]", el grado de tinción de la fracción se redujo significativamente.

Esto muestra que el anticuerpo anti-CK-B de conejo usado (el anticuerpo anti-CK-B de conejo frente a un antígeno que es un resto del aminoácido 1 al 100 desde el extremo N de la subunidad B de CK) y el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención [MAb frente a CK-BB y anticuerpo monoclonal CKBB] han competido para el antígeno (un resto del aminoácido 1 al 100 desde el extremo N de la subunidad B de CK).

55 A partir de los resultados descritos anteriormente, se ha aclarado que el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente

invención (MAb frente a CK-BB y anticuerpo monoclonal CKBB) es un anticuerpo que reconoce la región del aminoácido 1 al 100 de la subunidad B de CK.

Ejemplo comparativo 1

5 Se investigó si los anticuerpos que reconocen la región distinta de la "región del aminoácido 1 al 100 desde el extremo N" de la subunidad B de CK pueden evitar una influencia de CK-BB en la medición de CK-MB o no según el siguiente método.

(1) Preparación de la muestra de CK-BB

Se usó la misma muestra de CK-BB que en el Ejemplo 1.

(2) Preparación del primer reactivo

10 Mediante la adición de anticuerpos anti-CK-B disponibles comercialmente mostrados a continuación que reconocen una región diferente unos de otros a una disolución de tampón incluida en el kit (L-type Wako CK-MB mass), se prepararon las disoluciones de tampón que contenían anticuerpo (el primer reactivos) en la concentración de 5 µg/mL. El "antígeno" frente a cada anticuerpo se muestra sobre la base de la descripción respecto a una región del antígeno en el documento incluido de cada anticuerpo.

15 Anticuerpo a: un anticuerpo anti-CK-B que reconoce la secuencia de aminoácidos del aminoácido 200 al 300 desde el extremo N de la subunidad B de CK (anticuerpo policlonal de conejo anti-CK-BB, producido por Abcam plc).

Anticuerpo b: un anticuerpo anti-CK-B que reconoce la secuencia de aminoácidos del aminoácido 350 al extremo C desde el extremo N de la subunidad B de CK (anticuerpo policlonal de conejo anti-CK-BB, producido por Abcam plc).

20 Anticuerpo c: un anticuerpo anti-CK-B que reconoce la secuencia de aminoácidos del aminoácido 165 al 357 desde el extremo N de la subunidad B de CK (anticuerpo policlonal de conejo anti-CK-BB, producido por Abcam plc).

Anticuerpo d: MAb frente a CK-BB (producido por Meridian Life Science, Inc., el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención usado en el Ejemplo 1).

(3) Segundo reactivo

Se usó como el segundo reactivo la misma disolución de reactivo de látex incluida en el kit que la usada en el Ejemplo 1.

25 (4) Medición de CK-MB (método de 2 puntos finales)

Usando el mismo equipo que el usado en el Ejemplo 1, y en el mismo método, se llevó a cabo la medición de CK-MB.

(5) Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 3.

30 La Tabla 3 muestra el valor de la medición obtenido llevando a cabo la medición de CK-MB usando la muestra de CK-BB que contenía 400 ng/mL o 2000 ng/mL de CK-BB (valor de medición de CK-MB), y la relación del valor de la medición de CK-MB obtenido llevando a cabo la medición de CK-MB usando la muestra de CK-BB respecto a la concentración de CK-BB en la muestra de CK-BB usada para la medición (tasa de cruzamiento con CK-BB).

Tabla 3

Anticuerpo anti-CK-B	Sin adición	a	b	c	d
Valor de medición de CK-MB (ng/mL)					
400ng/mL (CK-BB)	18.6	18.9	18.5	16.1	3.2
2000ng/mL (CK-BB)	105.2	106.2	107.1	97.5	15.4
Tasa de cruzamiento con CK-BB					
400ng/mL (CK-BB)	4.6 %	4.7 %	4.6 %	4.0 %	0.8 %
2000ng/mL (CK-BB)	5.3 %	5.3 %	5.4 %	4.9 %	0.8 %

BB)					
-----	--	--	--	--	--

5 Como está claro a partir de la Tabla 3, el caso en el que la medición de CK-MB se llevó a cabo usando el primer reactivo que contenía los anticuerpos a a c, hubo poco cambio en la tasa de cruzamiento con CK-BB, comparado con el caso en el que la medición de CK-MB se llevó a cabo usando el primer reactivo que no contenía los anticuerpos a a c. Solo el caso en el que la medición de CK-MB se llevó a cabo usando el primer reactivo que contenía el anticuerpo d (anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención), la tasa de cruzamiento con CK-BB se redujo significativamente.

10 Como los resultados, se ha entendido que los anticuerpos (anticuerpos a a c) que reconocen la región distinta de la región desde el aminoácido 1 al 100 desde el extremo N de la subunidad B de CK son incapaces de suprimir una influencia de CK-BB sobre el sistema de medición de CK-MB.

Ejemplo 3

Usando L-type Wako CK-MB mass (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) que es el mismo kit disponible comercialmente para medir CK-MB que el usado en el Ejemplo 1, y según el método descrito en el documento incluido en el kit, se llevó a cabo la siguiente medición.

15 (1) Medición de CK-MB según el método de la presente invención

1) Muestra de medición

Se seleccionaron sueros humanos en los que se había confirmado la presencia de CK-BB de los sueros adquiridos de VERITAS Corp., NITTOBO Medical Co., Ltd., o International BioScience, Inc., y se usaron como la muestra de medición.

20 2) Preparación del primer reactivo

El anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención (Mab frente a CK-BB o anticuerpo monoclonal CK-BB) se añadió a una disolución de tampón incluida en el kit, y se preparó la disolución de tampón que contenía el anticuerpo (el primer reactivo) que tenía la concentración de 5 µg/mL.

25 Debe indicarse que, cuando la muestra de medición y el primer reactivo se mezclaron, la concentración del anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención en la disolución de reacción es 4.7 µg/mL.

3) Segundo reactivo

Se usó como el segundo reactivo la misma disolución de reactivo de látex incluida en el kit que la usada en el Ejemplo 1.

4) Medición de CK-MB (método de 2 puntos finales)

30 Usando un analizador automático LABOSPECT008 (fabricado por Hitachi High-Technologies Corp.), se llevó a cabo la medición. En 7 µL de muestra que contenía CK-MB de 1) descrito anteriormente, se mezclaron 100 µL del primer reactivo preparado en 2) descrito anteriormente, y después de incubar a 37 °C durante 5 minutos, se añadieron 33 µL del segundo reactivo y se incubó durante 5 minutos más. Se midió el cambio en la absorbancia a 660 nm de 30 segundos a 5 minutos después de la adición de la disolución de reactivo de látex.

35 Como un control, se midió CK-MB en la misma muestra usando el mismo reactivo y el mismo instrumento de medición por el mismo método, excepto por el uso de una disolución de tampón que no contenía el anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención.

(2) Medición de CK-MB por el método convencional (método de inmunoensayo electroquímico con luminiscencia)

40 Usando el reactivo ECLusys CK-MBII (producido por Roche Diagnostics Co., Ltd.) que es un kit para medir CK-MB por el método de inmunoensayo electroquímico con luminiscencia, y usando Cobas 8000 (producido por Roche Diagnostics Co., Ltd.), se midió CK-MB en la misma muestra.

(3) Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 4 a continuación.

45

Tabla 4

	Turbidimetría látex			Inmunoensayo electroquímico con luminiscencia
	Sin adición del anticuerpo anti-CK-B implicado en la presente invención	Adición de Mab frente a CK-BB	Adición de anticuerpo monoclonal CK-BB	
Muestra de reacción 1	5.8 ng/mL	3.0 ng/mL	1.9 ng/mL	2.62 ng/mL
Muestra de reacción 2	7.3 ng/mL	3.2 ng/mL	2.0 ng/mL	2.68 ng/mL
Muestra de reacción 3	8.1 ng/mL	1.5 ng/mL	1.1 ng/mL	0.48 ng/mL
Muestra de reacción 4	15.2 ng/mL	8.8 ng/mL	7.9 ng/mL	8.04 ng/mL

En la Tabla 4, en el caso en el que se obtuvo un valor de CK-MB igual a o menor que el valor estándar de referencia de la cantidad de proteína CK-MB "5.0 ng/mL (citado de Outline of Clinical Examination Methods, 33ª edición)", estos se mostraron sombreados.

Como está claro a partir de la Tabla 4, los valores de la medición obtenidos por el método de la presente invención ("Adición de Mab frente a CK-BB" o "Adición de anticuerpo monoclonal CKBB") son completamente consistentes en el criterio de punto de corte con el valor de medición obtenido por el método convencional de inmunoensayo electroquímico con luminiscencia, y se ha entendido que la fiabilidad del valor de medición obtenido por el método de la presente invención es mayor, comparado con los valores de medición obtenidos por la turbidimetría látex convencional ("Sin adición del anticuerpo anti-CK-B").

Aplicabilidad industrial

El método para medir CK-MB de la presente invención es capaz de medir CK-MB específicamente evitando su influencia, incluso cuando CK-BB coexiste en la muestra. Además, el método para medir CK-MB de la presente invención es útil ya que puede usarse para medir CK-MB, en el campo del examen clínico, porque es aplicable a un analizador automatizado de uso general.

Listado de secuencias

<110> Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

5 <120> Método para detectar CK-MB

<130> F1984WAKOPAT

<150> JP2014-093351

10 <151> 2014-04-30

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 1

Met Pro Phe Ser Asn Ser His Asn Ala Leu Lys Leu Arg Phe Pro Ala
1 5 10 15

Glu Asp Glu Phe Pro Asp Leu Ser Ala His Asn Asn His Met Ala Lys
20 25 30

Val Leu Thr Pro Glu Leu Tyr Ala Glu Leu Arg Ala Lys Ser Thr Pro
35 40 45

Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Val Ile Gln Thr Gly Val Asp Asn Pro
50 55 60

Gly His Pro Tyr Ile Met Thr Val Gly Cys Val Ala Gly Asp Glu Glu
65 70 75 80

Ser Tyr Glu Val Phe Lys Asp Leu Phe Asp Pro Ile Ile Glu Asp Arg
85 90 95

His Gly Gly Tyr
100

25 <210> 2

<211> 381

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 2

Met Pro Phe Ser Asn Ser His Asn Ala Leu Lys Leu Arg Phe Pro Ala
1 5 10 15

Glu Asp Glu Phe Pro Asp Leu Ser Ala His Asn Asn His Met Ala Lys
20 25 30

ES 2 708 781 T3

Val Leu Thr Pro Glu Leu Tyr Ala Glu Leu Arg Ala Lys Ser Thr Pro
 35 40 45
 Ser Gly Phe Thr Leu Asp Asp Val Ile Gln Thr Gly Val Asp Asn Pro
 50 55 60
 Gly His Pro Tyr Ile Met Thr Val Gly Cys Val Ala Gly Asp Glu Glu
 65 70 75 80
 Ser Tyr Glu Val Phe Lys Asp Leu Phe Asp Pro Ile Ile Glu Asp Arg
 85 90 95
 His Gly Gly Tyr Lys Pro Ser Asp Glu His Lys Thr Asp Leu Asn Pro
 100 105 110
 Asp Asn Leu Gln Gly Gly Asp Asp Leu Asp Pro Asn Tyr Val Leu Ser
 115 120 125
 Ser Arg Val Arg Thr Gly Arg Ser Ile Arg Gly Phe Cys Leu Pro Pro
 130 135 140
 His Cys Ser Arg Gly Glu Arg Arg Ala Ile Glu Lys Leu Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Ala Leu Ser Ser Leu Asp Gly Asp Leu Ala Gly Arg Tyr Tyr Ala Leu
 165 170 175
 Lys Ser Met Thr Glu Ala Glu Gln Gln Gln Leu Ile Asp Asp His Phe
 180 185 190
 Leu Phe Asp Lys Pro Val Ser Pro Leu Leu Leu Ala Ser Gly Met Ala
 195 200 205
 Arg Asp Trp Pro Asp Ala Arg Gly Ile Trp His Asn Asp Asn Lys Thr
 210 215 220
 Phe Leu Val Trp Val Asn Glu Glu Asp His Leu Arg Val Ile Ser Met
 225 230 235 240
 Gln Lys Gly Gly Asn Met Lys Glu Val Phe Thr Arg Phe Cys Thr Gly
 245 250 255
 Leu Thr Gln Ile Glu Thr Leu Phe Lys Ser Lys Asp Tyr Glu Phe Met
 260 265 270
 Trp Asn Pro His Leu Gly Tyr Ile Leu Thr Cys Pro Ser Asn Leu Gly

ES 2 708 781 T3

275		280		285											
Thr	Gly	Leu	Arg	Ala	Gly	Val	His	Ile	Lys	Leu	Pro	Asn	Leu	Gly	Lys
	290					295					300				
His	Glu	Lys	Phe	Ser	Glu	Val	Leu	Lys	Arg	Leu	Arg	Leu	Gln	Lys	Arg
305					310					315					320
Gly	Thr	Gly	Gly	Val	Asp	Thr	Ala	Ala	Val	Gly	Gly	Val	Phe	Asp	Val
				325					330					335	
Ser	Asn	Ala	Asp	Arg	Leu	Gly	Phe	Ser	Glu	Val	Glu	Leu	Val	Gln	Met
			340					345						350	
Val	Val	Asp	Gly	Val	Lys	Leu	Leu	Ile	Glu	Met	Glu	Gln	Arg	Leu	Glu
		355					360						365		
Gln	Gly	Gln	Ala	Ile	Asp	Asp	Leu	Met	Pro	Ala	Gln	Lys			
370						375					380				

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir la isozima MB de la creatina quinasa (de aquí en adelante en la presente memoria abreviada como CK-MB) en una muestra, que comprende:

5 (1) una etapa para hacer reaccionar la muestra con un anticuerpo anti-CK-B que reconoce una región del aminoácido 1 al 100 desde el extremo N en la secuencia de aminoácidos de una subunidad B de la creatina quinasa, y después hacer reaccionar con un primer anticuerpo frente a CK-MB y un segundo anticuerpo frente a CK-MB que reconoce un epítipo diferente del reconocido por el primer anticuerpo frente a CK-MB,

en donde el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo reacciona no solo con CK-MB sino también con una isozima BB de la creatina quinasa (de aquí en adelante en la presente memoria abreviada como CK-BB) (etapa 1);

10 (2) una etapa para medir un cambio óptico generado por la reacción (etapa 2); y

(3) una etapa para determinar una cantidad de CK-MB en la muestra sobre la base del resultado obtenido en la etapa 2 (etapa 3).

2. El método según la reivindicación 1, en donde el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo reconocen ambos una subunidad M y la subunidad B de CK-MB.

15 3. El método según la reivindicación 1, en donde la región que va a ser reconocida por el anticuerpo anti-CK-B es la que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1.

4. El método según la reivindicación 1, en donde el cambio óptico es cambio en la absorbancia, cambio en la turbidez o cambio en la intensidad de la luz dispersada.

20 5. El método según la reivindicación 1, en donde el primer anticuerpo y/o el segundo anticuerpo están inmovilizados en un vehículo insoluble.

6. El método según la reivindicación 5, en donde el vehículo insoluble es una partícula de látex.

7. Un método para evitar una influencia de CK-BB en la medición de CK-MB con un primer anticuerpo frente a CK-MB y un segundo anticuerpo frente a CK-MB que reconoce un epítipo diferente del reconocido por el primer anticuerpo,

25 en donde el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo reacciona no solo con CK-MB sino también con CK-BB, que comprende tratar una muestra con un anticuerpo anti-CK-B que reconoce una región del aminoácido 1 al 100 desde el extremo N en la secuencia de aminoácidos de la subunidad B de la creatina quinasa.

8. El método según la reivindicación 7, en donde la medición de CK-MB se lleva a cabo usando un primer anticuerpo frente a CK-MB y un segundo anticuerpo frente a CK-MB que reconoce un epítipo diferente del reconocido por el primer anticuerpo, y la medición se ve influida por CK-BB.

30 9. Un kit para medir CK-MB que comprende a primer anticuerpo frente a CK-MB, un segundo anticuerpo frente a CK-MB que reconoce un epítipo diferente del reconocido por el primer anticuerpo,

en donde el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo reacciona no solo con CK-MB sino también con CK-BB, y un anticuerpo anti-CK-B que reconoce una región del aminoácido 1 al 100 desde el extremo N en la secuencia de aminoácidos de la subunidad B de la creatina quinasa.

35 10. El kit según la reivindicación 9, en donde el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo reconocen ambos la subunidad M y la subunidad B de CK-MB.

11. El kit según la reivindicación 9, que comprende un primer reactivo que contiene el anticuerpo anti-CK-B, y un segundo reactivo que contiene el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo.

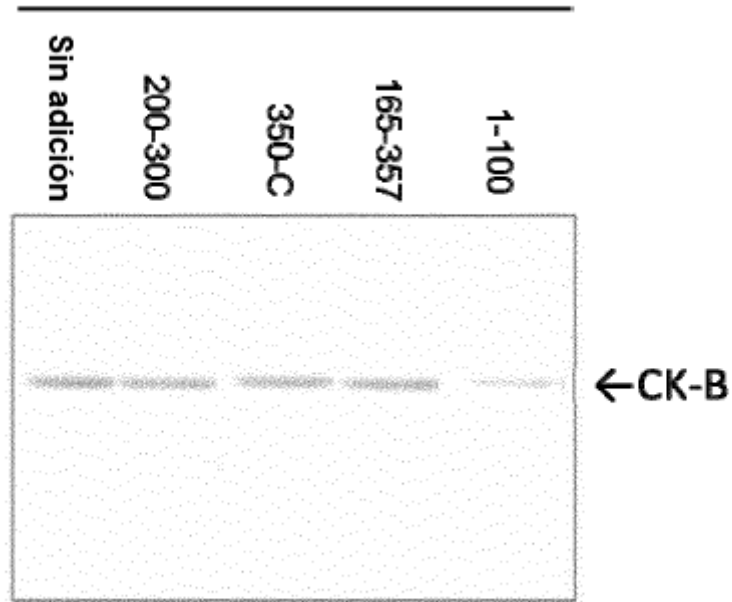
40 12. El kit según la reivindicación 9, en donde la región reconocida por el anticuerpo anti-CK-B es la que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1.

13. El kit según la reivindicación 9, en donde el primer anticuerpo y/o el segundo anticuerpo están inmovilizados en un vehículo insoluble.

14. El kit según la reivindicación 13, en donde el vehículo insoluble es una partícula de látex.

[Fig. 1]

Antígeno frente a anticuerpo anti-CK-B de conejo



[Fig. 2]

Antígeno frente a anticuerpo anti-CK-B de conejo

