



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

UIBM

DOMANDA NUMERO	101996900561698
Data Deposito	06/12/1996
Data Pubblicazione	06/06/1998

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N		

Titolo

IMMUNOPURIFICAZIONE DI UN ANTIGENE DALL'APPARENTE PESO MOLECOLARE DI 16 +- 2 KDA DELL' HELICOBACTER PYLORI E METODI PER LA SUA DETERMINAZIONE.

Classe Internazionale: C07K

Descrizione del trovato avente per titolo:

"IMMUNOPURIFICAZIONE DI UN ANTIGENE DALL'APPARENTE
PESO MOLECOLARE DI 16 ± 2 kDa DELL'*HELICOBACTER*
5 *PYLORI* E METODI PER LA SUA DETERMINAZIONE"

a nome SANITARIA SCALIGERA SpA

a 37127 AVESA (Verona)

dep. n. VR96A000109 del -6 DIC. 1996

10 CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente invenzione si riferisce generalmente a:

- a) un ibridoma che produce un anticorpo monoclonale che immunoreagisce con un antigene di *Helicobacter pylori* avente un apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa;
- 15 b) l'anticorpo monoclonale prodotto da detto ibridoma;
- c) i metodi ed i sistemi diagnostici che fanno uso di anticorpi monoclonali oppure di anticorpi policlonali che reagiscono con un antigene di 16 ± 2 kDa del *Helicobacter pylori*;
- 20 d) un preparato antigenico di una molecola avente un apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa ottenuto da *Helicobacter pylori* e metodi per usare questo preparato antigenico in analisi diagnostiche in relazione a infezioni da *Helicobacter pylori*;
- 25 e) l'uso dello specifico riconoscimento immunologico di un



- 5 anticorpo monoclonale, denominato Helix-1 e prodotto da un ibridoma denominato 2H11, o di anticorpi mono e/o policlonali diretti contro l'antigene dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa per rilevare, in un campione solido o liquido, la presenza di *Helicobacter pylori* e/o dell'antigene di 16 ± 2 kDa dell'*Helicobacter pylori* e/o di aggregati dell'antigene di 16 ± 2 kDa e/o di frammenti dell'antigene di 16 ± 2 kDa;
- 10 f) la determinazione qualitativa e/o quantitativa di una sostanza prodotta da *Helicobacter pylori* dall'apparente peso molecolare di 16 kDa, con un'approssimazione di 2 kDa, in difetto o in eccesso, quando determinata mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodiododecilsolfato. Tale sostanza è altamente
- 15 specifica per l'*Helicobacter pylori* e quindi rappresenta un marcatore della presenza del batterio nel campione analizzato oppure nell'ambiente da cui il campione deriva;
- 20 g) metodi analitici per l'individuazione della presenza di una sostanza dell' *Helicobacter pylori* dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa, in un campione di materiale solido o liquido, derivante da un organismo oppure dall'ambiente oppure da una coltura in vitro.

STATO DELLA TECNICA

25 *Helicobacter pylori* è un batterio Gram-negativo curvo



che è considerato essere la principale causa di gastrite ed ulcera peptica nell'uomo.

E' stato anche provato che l'infezione da *Helicobacter pylori* è associata al cancro gastrico ed al linfoma gastrico tipo MALT.

Si sospetta che tale infezione sia anche associata all'insorgenza di varie patologie cardiocircolatorie, quali ad esempio l'infarto al miocardio.

L'infezione provocata da questo organismo è molto frequente, e normalmente è cronica se non trattata con farmaci antimicrobici.

L'eradicazione dell'infezione determina la guarigione dell'ulcera peptica e ne previene le recidive; di conseguenza è ora considerata la principale cura per le persone affette da ulcera duodenale.

Le cure più efficaci attualmente utilizzate per l'eradicazione dell'infezione sono basate su combinazioni di farmaci.

Il problema principale nelle attuali terapie è rappresentato dal fenomeno della resistenza ai composti utilizzati, in particolare al metronidazolo.

Un altro aspetto importante che viene attualmente molto studiato riguarda le modalità di trasmissione dell'infezione. Si sospetta che esse siano di tipo interpersonale (oro-orale o oro-fecale) o da veicoli o sorgenti esterne (per



esempio, alimenti, contatti con animali).

L'infezione gastrica da *Helicobacter pylori* può essere diagnosticata ricercando il batterio direttamente sul campione biotico prelevato in corso di gastro-duodenoscopia.

5 I metodi impiegati a tale riguardo sono la coltura, la ricerca dell'ureasi batterica, il semplice esame istologico.

La coltura è considerata il test più specifico, in quanto l'identificazione del batterio si basa su criteri morfologici (forma curva e spiraliforme, Gram negatività) e
10 biochimici (positività alla catalasi, ossidasi, ureasi e fosfatasi alcalina; negatività alla idrolisi dell'ippurato e alla riduzione del nitrato).

Il maggiore problema del test colturale è rappresentato dalla contaminazione da parte di altri batteri o funghi, cui
15 si tenta di sopperire utilizzando terreni resi il più possibile selettivi mediante l'aggiunta di antibiotici.

Esistono inoltre tests che consentono di diagnosticare l'infezione da *Helicobacter pylori* senza ricercarlo sul prelievo biotico; sono la ricerca degli anticorpi nel siero e
20 l'"urea breath test" (ricerca di CO₂ marcata nel respiro).

Questi ultimi sono denominati tests "non invasivi", perchè non richiedono la gastroscopia.

Ognuno dei test invasivi e non invasivi elencati presenta vantaggi e svantaggi, in termine di sensibilità, specificità, praticità e costo.
25



La ricerca dell'*Helicobacter pylori* diventa più problematica quando lo si voglia ricercare al di fuori dello stomaco, ad esempio nelle feci o nel cavo orale, dove la flora microbica è estremamente abbondante ed eterogenea e quindi
5 l'isolamento molto difficile.

Analoghe difficoltà si ritrovano quando si tenta di isolare il batterio da ipotizzabili sorgenti o veicoli di infezione (acque, alimenti, terreno, altro).

Sono quindi necessari metodi alternativi per la ricerca
10 del batterio che possano sostituire o integrare i precedenti sia a livello diagnostico che epidemiologico.

Una valida alternativa può essere rappresentata da metodiche di tipo immunodiagnostico.

La reazione antigene-anticorpo forma la base di tutti i
15 metodi di test immunologici.

Gli anticorpi vengono prodotti da un animale in risposta alla presenza di una sostanza estranea all'organismo (antigene).

La risposta immunologica ad un antigene ha condotto allo sviluppo di un certo numero di tecniche che sono usate
20 per diagnosticare malattie nell'uomo e nell'animale.

Allo scopo di rilevare la presenza di microrganismi (batteri o virus) nei fluidi e tessuti corporei (urina, siero, plasma, campioni tissutali o altro), in liquidi o in solidi
25 (cibi, terreni selettivi, terra, ecc.) possono essere



utilizzati dei metodi di test immunologico.

I test in vitro per rilevare la presenza di un determinato antigene o anticorpo in un campione vengono effettuati aggiungendo la controparte immunologica ad una soluzione
5 contenente il campione in esame, cioè aggiungendo anticorpi nel caso in cui si desidera rilevare la presenza dell'antigene oppure il contrario.

Il documento US-A-4,882,271 descrive una preparazione di antigeni di *Campyobacter pylori* e l'impiego di tale preparazione nei test sierologici.
10

In questo documento viene rivendicata una preparazione antigenica che è composta da molecole con pesi molecolari che vanno da 300 a 700 kDa e con punti isoelettrici varianti da 5,9 a 6,3.

Nel documento PCT/IE95/00037 viene descritta una preparazione antigenica di *Helicobacter pylori* depletata di tutti gli antigeni con peso molecolare inferiore a 30 kDa ed il suo utilizzo in test sierologici per la ricerca di anticorpi diretti contro l'*Helicobacter pylori* in soggetti con infezione da *Helicobacter pylori*.
15
20

Nel documento US-A-5,262,156 viene descritta un'altra preparazione antigenica di *Helicobacter pylori* ottenuta mediante vari passaggi di purificazione e comprendente molecole con peso molecolare di 116, 84, 19 e 14 kDa.

25 Questa preparazione antigenica viene utilizzata per



l'individuazione di anticorpi anti-*Helicobacter pylori* nei soggetti con infezione da *Helicobacter pylori*.

Il documento PCT/US93/01558 descrive una tossina vacuolante, con peso molecolare superiore a 972 kDa, purificata da *Helicobacter pylori* ed il suo utilizzo come vaccino.

Inoltre vengono descritti metodi per test sierologici e per la ricerca dell'antigene.

Il documento PCT/US92/03284 divulga materiali e metodi utili per la diagnosi e la terapia delle malattie gastriche indotte da *Helicobacter pylori*.

In particolar modo viene rivendicato un metodo per misurare le IgE di un individuo che reagiscono con allergeni batterici comprendenti quelli dell'*Helicobacter pylori*.

Il documento PCT/US94/14239 rivendica una preparazione di antigeni utili per la diagnosi di infezione da *Helicobacter pylori* mediante test di tipo sierologico.

In particolar modo vengono rivendicati i metodi per individuare una reazione tra le immunoglobuline di un individuo con gli antigeni isolati da una libreria di antigeni specifici del microrganismo con particolare riguardo all'*Helicobacter pylori*.

Nel documento PCT/SE94/00021 viene descritta una preparazione antigenica di *Helicobacter pylori* per la terapia e la profilassi dell'infezione da *Helicobacter pylori*.

In particolare la preparazione antigenica contiene una



proteina con peso molecolare di 120 kDa e frammenti di tale proteina con pesi molecolari di circa 20 kDa.

Inoltre vengono rivendicati vaccini, anticorpi mono e policlonali contro tale preparazione e metodi per l'individuazione dell'*Helicobacter pylori*.

Tutti questi documenti descrivono sia la preparazione di miscele di antigeni dell'*Helicobacter pylori* sia l'utilizzo di tali miscele nei test sierologici per l'individuazione di anticorpi diretti contro l'*Helicobacter pylori* nei soggetti con tale infezione.

Tuttavia, nessuno di tali documenti divulga i seguenti aspetti:

- a) l'utilizzo a scopo diagnostico di un antigene dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa dell'*Helicobacter pylori* per la ricerca del batterio;
- b) un ibridoma produttore anticorpi monoclonali diretti contro un'antigene dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa dell'*Helicobacter pylori* ;
- c) la ricerca, mediante test di tipo chimico-fisico o immunologico, dell'antigene dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa dell'*Helicobacter pylori* allo scopo di diagnosticare la presenza di *Helicobacter pylori* nel campione in esame o nel luogo da cui deriva il campione.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Secondo un primo aspetto, la presente invenzione si ri-



ferisce ad un antigene di *Helicobacter pylori* dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa ed al suo utilizzo per la ricerca dell'*Helicobacter pylori*.

5 Secondo un altro aspetto, la presente invenzione si riferisce ad un anticorpo monoclonale che reagisce in modo specifico con un antigene di 16 ± 2 kDa dell'*Helicobacter pylori*.

10 L'invenzione si basa sul principio che la presenza di questo particolare antigene dell'*Helicobacter pylori* in un qualsiasi tipo di campione è indicativa della presenza del batterio nella sede da cui il campione proviene.

Tale sede può essere rappresentata da un organismo, umano o animale, oppure dall'ambiente, ad esempio un alimento, oppure da una coltura in vitro a scopo diagnostico.

15 L'antigene può essere ricercato con tecniche immunologiche e/o chimico-fisiche.

Un ulteriore aspetto di questa invenzione riguarda un ibridoma chiamato 2H11; tale ibridoma 2H11 è oggetto di deposito ECACC No.

20 L'anticorpo monoclonale prodotto dall'ibridoma 2H11 è indicato con la sigla Helix-1.

25 Secondo un altro aspetto, questa invenzione riguarda anticorpi monoclonali, indicati con la sigla Helix-1, prodotti dall'ibridoma 2H11, che immunoreagiscono in modo specifico con un antigene di *Helicobacter pylori* che ha un ap-



parente peso molecolare di 16 ± 2 kDa, e sono secreti dall'ibridoma 2H11.

La presente invenzione riguarda inoltre metodi analitici per determinare la presenza dell'antigene *Helicobacter pylori* con un apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa.

L'antigene è identificato in modo specifico ed univoco dall'anticorpo monoclonale Helix-1.

Ancora, l'invenzione riguarda l'uso dello specifico riconoscimento immunologico dell'anticorpo monoclonale Helix-1, oppure di suoi frammenti oppure di anticorpi monoclonali e/o policlonali o di frammenti di essi in grado di riconoscere in modo specifico l'antigene dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa per rilevare in un campione la presenza di *Helicobacter pylori*, oppure dell'antigene di 16 ± 2 kDa oppure di aggregati di antigene di 16 ± 2 kDa, oppure di frammenti di antigene di 16 ± 2 kDa.

Questi ed altri aspetti dell'invenzione vengono affrontati fornendo un anticorpo monoclonale Helix-1 che si lega mediante una reazione antigene/anticorpo con un antigene dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa prodotto dall'*Helicobacter pylori*.

Conformemente all'invenzione, l'anticorpo Helix-1 presenta un'elevata specificità per l'*Helicobacter pylori* in quanto non riconosce antigeni prodotti dalle numerose specie batteriche e fungine analizzate: *Campylobacter*, *Pseudomonas*,



Escherichia coli, Proteus, Salmonella, Enterococco, Stafilococco, Candida, Neisseria, Klebsiella e Streptococco.

DESCRIZIONE DELLA PRODUZIONE DELL'IBRIDOMA 2H11 E
5 DELLA CARATTERIZZAZIONE DELL'ANTICORPO MONOCLONALE
HELIX-1 SECRETO DALL'IBRIDOMA 2H11

Produzione dell'ibridoma 2H11

a) Immunizzazione e fusione

10 Topi femmina Balb/c furono immunizzati per via sottocutanea con una sospensione di *Helicobacter pylori* (circa 10^8 cellule per ml), in un volume di 500 microlitri (giorno 0).

Due successive immunizzazioni furono effettuate al quattordicesimo ed al ventottesimo giorno, con la stessa
15 quantità di antigene.

Tre giorni prima della fusione agli animali furono infine inoculati con 500 microlitri di *Helicobacter pylori* in sospensione per via endovenosa.

La fusione delle cellule spleniche con la linea cellulare di mieloma X63-Ag8.653 fu effettuata secondo il metodo
20 di Kohler G. e Milstein C. (Nature 256:495 497, 1975).

La crescita e la selezione degli ibridi furono effettuate secondo metodiche standard (Goding 1983).

I supernatanti dei pozzetti che mostravano crescita
25 cellulare furono analizzati per la presenza di attività an-



ticorpale diretta verso l'*Helicobacter pylori* allo scopo di individuare e di isolare gli ibridomi produttori anticorpi specifici.

5 A tale scopo è stata impiegata la tecnica descritta nel successivo paragrafo b).

b) Ricerca degli ibridomi produttori anticorpi monoclonali anti-*Helicobacter pylori*

10 Una preparazione antigenica rappresentata da un sonicatedo di una sospensione di *Helicobacter pylori* fu diluita 1:1000 (v/v) con tampone carbonato 50 mM a pH 9,6 e 100 microlitri della diluizione furono incubati per 16 ore nei pozzetti di una piastra microtiter (Maxisorp, Nunc).

15 Dopo aver lavato i pozzetti della piastra microtiter con soluzione fisiologica, furono dispensati, in tutti i pozzetti, 200 microlitri di PBS (pH7,4) contenente 10 mg/ml di albumina bovina (BSA, frazione V, Sigma).

20 La piastra fu nuovamente incubata per 16 ore a 4°C. Dopo lavaggio con soluzione fisiologica, 100 microlitri dei supernatanti cellulari furono aggiunti ai pozzetti della piastra microtiter preparata precedentemente e incubati per 2 ore a temperatura ambiente.

25 I pozzetti furono accuratamente lavati con PBS e 100 microlitri di immunoglobuline di capra anti-immunoglobuline di topo coniugate con l'enzima perossidasi (goat anti-mouse immunoglobulins-HRP labeled) furono aggiunti a ciascun poz-



zetto.

Dopo un'ora di incubazione a temperatura ambiente i pozzetti furono lavati con PBS.

200 microlitri di tampone sodio citrato 0,1M a pH 4,75, contenente 1 mg/ml di urea perossido e 1 mg/ml di o-
5 fenilendiammina (OPD) furono dispensati in tutti i pozzetti.

Dopo 15 minuti la reazione enzimatica fu bloccata con 50 microlitri di 2N HCl, e le assorbanze furono misurate a 492 nm.

10 **c) Preparazione degli anticorpi monoclonali Helix-1 anti-*Helicobacter pylori***

Il liquido ascitico contenente gli anticorpi monoclonali secondo la presente invenzione fu ottenuto inoculando intraperitonealmente in topi Balb/c di 10 settimane, precedentemente trattati con 0.5 ml di pristane, 10^6 cellule di
15 ibridoma 2H11.

Il tempo medio per lo sviluppo del liquido ascitico fu di 15 giorni.

L'anticorpo monoclonale purificato Helix-1 fu preparato
20 mediante cromatografia di affinità su colonna impaccata con resina Proteina A-Sepharose CL-4B (Pharmacia Biotech, Uppsala, Svezia).

d) Determinazione dell'isotipo dell'anticorpo monoclonale Helix-1

25 Il supernatante derivato da cellule clonate dell'ibri-



doma 2H11 fu utilizzato per determinare l'isotipo degli anticorpi monoclonali Helix-1 utilizzando il kit per la determinazione dell'isotipo di ibridoma di topo prodotto da Bio-Rad Laboratories (Milano, Italia).

5 L'anticorpo Helix-1 prodotto dall'ibridoma 2H11 apparteneva all'isotipo immunoglobulinico IgG1.

e) Caratterizzazione del peso molecolare dell'antigene riconosciuto dall'anticorpo monoclonale Helix-1.

10 10 ml di resina Affi Gel 10 (Bio-Rad Laboratories) furono lavati tre volte con 50 ml di tampone 10 mM sodio acetato con pH 4,5. 10 ml di anticorpo monoclonale Helix-1, ad una concentrazione di 5 mg/ml in 0,1 M MOPS, pH 7,5 furono aggiunti alla resina lavata.

15 Dopo 2 ore di incubazione a temperatura ambiente la resina fu lavata due volte con 50 ml di PBS.

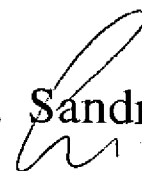
Eventuali gruppi attivi residui furono quindi saturati incubando la resina per due ore con 20 ml di 0,1 M etanolamina con pH 8,5.

20 Infine la matrice accoppiata con l'anticorpo fu lavata con 100 ml di tampone 0,1M sodio acetato con pH 4,0 e con 100 ml di PBS.

L'anticorpo Helix-1 covalentemente legato alla resina Affi-Gel 10 fu utilizzato in cromatografia d'affinità per la purificazione dell'antigene.

25 Una preparazione antigenica rappresentata da un sonica-





to di una sospensione di *Helicobacter pylori* (20 ml) venne caricata nella colonna cromatografica ad un flusso di 1 ml/min utilizzando una pompa peristaltica.

5 Dopo aver lavato la resina con 100 ml PBS, l'antigene legato all'anticorpo Helix-1 venne rimosso dalla colonna usando 20 ml di 10 mM HCl.

La soluzione acida antigenica ottenuta dalla colonna fu immediatamente neutralizzata con 2 ml di 1 M Na_2HPO_4 .

10 Il peso molecolare della molecola di *Helicobacter pylori* purificata utilizzando l'anticorpo Helix-1 fu determinato mediante elettroforesi in gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) secondo la tecnica di Laemmli nel 1970 (Nature, 227, 680-685).

15 La molecola di *Helicobacter pylori* purificata per affinità fu diluita 1:2 con il tampone 120 mM Tris, pH 6,8, contenente glicerolo 10%, SDS 2%, 2-mercaptoetanololo 5%; bromofenolo blu 0,002%) e bollita per 5 minuti.

20 20 ml della soluzione furono caricati su di un gel di poliacrilammide al 15%.

L'elettroforesi venne effettuata a 40 mA (corrente costante) per 2 ore a temperatura ambiente.

25 Il peso molecolare dell'antigene *Helicobacter pylori* purificato mediante cromatografia d'affinità fu determinato utilizzando un una miscela di pesi molecolari standard (da 14,4 kDa a 97 kDa; BioRad Laboratories).



Il gel fu colorato con la tecnica Silver-stain utilizzando il kit BioRad.

L'analisi elettroforetica del preparato antigenico ottenuto mediante cromatografia d'affinità permise di identificare un'unica banda elettroforetica che confrontata con gli standard dei pesi molecolari aveva un peso molecolare apparente di circa 16 ± 2 kDa con un'approssimazione, relativamente ai pesi molecolari standard sopra utilizzati, di 2 kDa in eccesso e difetto.

5
10 Mediante cromatografia liquida ad esclusione molecolare (size exclusion liquid chromatography) è stato valutato il peso molecolare dell'antigene riconosciuto dell'anticorpo monoclonale Helix-1 utilizzando condizioni tali da mantenere la molecola in forma nativa. Il processo cromatografico è
15 stato eseguito utilizzando una fase mobile composta da un tampone fosfato a pH 7,4 (PBS Dulbecco)

Il peso molecolare è stato calcolato precalibrando la colonna cromatografica con il set degli standard dei pesi molecolari della ditta Bio-Rad.

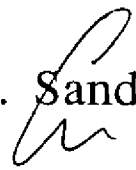
20 Il peso molecolare calcolato in condizioni native mediante cromatografia ad esclusione molecolare era compreso tra 400 e 600 kDa.

DESCRIZIONE DI ALCUNE FORME PREFERITE DI

REALIZZAZIONE DELL'INVENZIONE

25 Come più sopra riportato, l'invenzione si riferisce a





tutti i metodi di analisi, sia di tipo immunologico che chimico-fisico, per determinare la presenza di una molecola dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa di *Helicobacter pylori* in un campione sia liquido che solido.

5 In questo contesto, ricordiamo che l'anticorpo monoclonale Helix-1 prodotto dall'ibridoma 2H11 riconosce in modo specifico una molecola dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa prodotta dall'*Helicobacter pylori*.

10 Secondo una importante caratteristica della presente invenzione, l'anticorpo Helix-1 rappresenta lo strumento di identificazione univoca di una molecola dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa prodotta dall'*Helicobacter pylori*.

15 La presenza di tale molecola, in un campione sia solido che liquido, potrà quindi essere determinata mediante test chimico-fisici (ad esempio mediante cromatografia) o immunologici utilizzando anticorpi monoclonali e/o policlonali o frammenti immunologicamente attivi di essi oppure mediante reazioni di affinità con altre molecole (ad esempio recettori cellulari, lectine, zuccheri, fosfolipidi, enzimi, peptidi ecc.).

20

 Nella esecuzione di un metodo analitico in grado di accertare la presenza, in un qualsiasi tipo di campione, di una molecola dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa di *Helicobacter pylori*, l'uso dell'anticorpo monoclonale Helix-

25 1, secondo la presente invenzione, è particolarmente vantag-



gioso.

Secondo una forma di realizzazione particolarmente vantaggiosa dell'invenzione, un metodo per accertare la presenza dell'antigene dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa di *Helicobacter pylori* comprende le seguenti fasi:

- a) fornire un generico campione da analizzare. Tipicamente questo campione è fornito come una data quantità di un mezzo solido che viene opportunamente trattato prima dell'analisi, come una sospensione ottenuta da un campione solido, oppure come un campione liquido;
- b) fornire un anticorpo monoclonale e/o policlonale in un formato biologicamente attivo che immunoreagisca con l'antigene dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa di *Helicobacter pylori*;
- c) miscelare il campione con l'anticorpo della fase b) per formare una miscela di immunoreazione;
- d) mantenere la miscela in condizioni opportune per favorire la reazione tra antigene e anticorpo per un periodo di tempo variante da pochi minuti ad ore;
- e) accertare se sia verificata una reazione antigene-anticorpo e quindi stabilire se nel campione in esame era presente la molecola dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa di *Helicobacter pylori*, e determinarne eventualmente la sua concentrazione.

Il metodo analitico di tipo immunologico sopra descritt-



to può essere effettuato utilizzando una grande varietà di metodi e di formati di realizzazione ben noti agli esperti di immunodiagnostica.

Nei prototipi in cui l'evidenziazione della presenza dell'antigene dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa di *Helicobacter pylori* avviene mediante un anticorpo marcato, ad esempio con un isotopo radioattivo, chemiluminescente, un enzima o una sostanza fluorescente, detto anticorpo rivelatore potrà essere rappresentato dall'anticorpo monoclonale e/o policlonale nella forma intera o frammentata, purchè reagisca con una molecola dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa di *Helicobacter pylori*.

Nonostante i metodi di dosaggio immunologico di seguito descritti utilizzino dei formati che prevedono l'impiego di una fase solida (metodi di dosaggio immunologico eterogeneo), l'invenzione non è limitata a questi ultimi, ma comprende anche i metodi di dosaggio immunologico di tipo omogeneo.

Si definiscono come "fase solida" tutte le matrici solide accoppiate a molecole biologiche.

I metodi di dosaggio immunologico eterogeneo possono essere preparati accoppiando una matrice solida sia con l'anticorpo monoclonale Helix-1 che con altri anticorpi mono e/o policlonali, diretti contro una molecola dall'apparente peso molecolare 16 ± 2 kDa di *Helicobacter pylori* ed ottenu-



ti da animali (topi, ratti, conigli, pecore, polli, ecc.) immunizzati con *Helicobacter pylori* e/o una molecola dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa di *Helicobacter pylori*.

5 Un altro tipo di fase solida può essere ottenuta legando ad una matrice solida l'antigene dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa di *Helicobacter pylori* o preparati di *Helicobacter pylori* contenenti l'antigene di 16 ± 2 kDa dell'*Helicobacter pylori*.

10 Le matrici solide utilizzate nei metodi immunodiagnostici eterogenei includono polimeri di destrano, agarosio, PVC, polistirene, polistirolo, polietilene, poliacrilammide, nitrocellulosa, nylon e possono avere svariate forme come fogli, strisce, tubi, piastre microtiter, palline ecc.

15 Esistono inoltre matrici solide costituite da polimeri sintetici adatte per i test di agglutinazione come ad esempio polistirene, divinilbenzene, etilendimetacrilato, etilmetacrilato, bromostirene, polivinilacetato, polivinilpiridina, ecc.

20 La presenza di antigene dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa di *Helicobacter pylori* in campioni sia liquidi che solidi può essere accertata, sia tramite metodi di dosaggio immunologico di tipo competitivo che non competitivo.

25

ESEMPIO 1



Test di agglutinazione al lattice per l'individuazione dell'antigene dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa dell'*Helicobacter pylori*.

- 5 Legame covalente dell'anticorpo monoclonale Helix-1 con lattice carbossilato.

L'anticorpo monoclonale purificato Helix-1 è stato legato covalentemente ad un lattice carbossilato (Bang's Laboratories) usando come reagenti chimici di legame 1-etil-3-
10 (3-dimetilamminopropil)carbodiimmide (EDAC) e N-idrossisuccinammide (NHS).

1 ml di lattice carbossilato (1 micron di diametro) al 10% di solido è stato diluito 10 volte con acqua deionizzata e centrifugato a 6000 giri per 30 minuti.

- 15 Dopo aver aspirato il supernatante, il pellet è stato lavato tre volte con un totale di 30 ml di acqua deionizzata mediante centrifugazione.

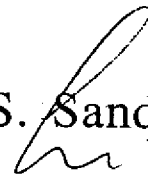
Dopo l'ultima fase di lavaggio il pellet è stato risospeso con 5 ml di acqua deionizzata.

- 20 Alla sospensione di lattice sono stati aggiunti 5 ml di una miscela composta da EDAC/NHS (200 mM/50 mM in acqua).

Dopo 2 ore di incubazione a temperatura ambiente le particelle di lattice sono state lavate tre volte con 10 ml di acqua deionizzata.

- 25 Dopo l'ultima fase di lavaggio sono stati aggiunti al





pellet 5 ml di soluzione Helix-1 (0,4 mg/ml in 20mM tampone Hepes, pH 7,3).

La sospensione è stata quindi incubata per 18 ore a 4°C. Infine, la sospensione di lattice è stata lavata due volte con acqua deionizzata e, allo scopo di disattivare eventuali gruppi attivi, sono stati aggiunti 10 ml di 0,1M etanolamina a pH 8,3.

Dopo due ore di incubazione sono state eseguite tre fasi di lavaggio con 30 ml di PBS.

10 Il pellet ottenuto dopo l'ultimo lavaggio è stato diluito in modo da ottenere una quantità di solido di 0,5% utilizzando un tampone composto da 10mM Hepes pH 7,4 contenente 10 mg/ml BSA Frazione V, 1 mM EDTA, 0,05% Brij e 0,045% sodio azide, 100 µg/ml di immunoglobuline aspecifiche di topo).

15 **Reazione di agglutinazione delle particelle di lattice attivate con Helix-1 mediante aggiunta di antigene dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa dell'*Helicobacter pylori*.**

20 Il test di agglutinazione è stato eseguito utilizzando le microparticelle di lattice alle quali sono stati legati covalentemente gli anticorpi Helix-1.

Fornire questo reagente come kit permette di determinare la presenza di *Helicobacter pylori* e/o antigene dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa dell'*Helicobacter py-*



lori secondo le seguenti procedure.

La sospensione di microparticelle ricoperte con Helix-1 (30 microlitri) è stata distribuita su di una lastrina di vetro per test di agglutinazione.

5 Il campione in esame, ad esempio, colonie batteriche o un frammento bioptico prelevato in corso di esame endoscopico, è stato aggiunto alla sospensione di microparticelle coniugate con l'anticorpo Helix-1. La miscela formata da campione e microparticelle è stata mescolata con una bacchetta
10 sterile per circa 10-20 secondi.

La sospensione di lattice contenente il campione in esame è stata rimescolata delicatamente per ulteriori 30 secondi muovendo la lastrina di vetro.

Durante i 30 secondi di incubazione le particelle di
15 lattice attivato con Helix-1 reagiscono con l'antigene dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa dell'*Helicobacter pylori* producendo un agglutinato visibile.

ESEMPIO 2

20 METODI IMMUNOENZIMATICI (ELISA) PER LA RICERCA
DELL'ANTIGENE DALL'APPARENTE PESO MOLECOLARE DI $16 \pm$
2 kDa DELL'*HELICOBACTER PYLORI*.

ELISA non competitivo eterogeneo.

25 Preparazione della fase solida.



Immunoglobuline purificate di Helix-1 oppure anticorpi mono e/o policlonali che riconoscono l'antigene dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa dell'*Helicobacter pylori* sono stati assorbiti sulla plastica dei pozzetti di una piastra microtiter (NUNC, Maxisorp) aggiungendo 100 microlitri di una soluzione di anticorpi alla concentrazione di 10 $\mu\text{g/ml}$ in tampone 50 mM sodio carbonato a pH 9,6.

La piastra microtiter è stata mantenuta per 18 ore a temperatura ambiente e quindi lavata 2 volte con PBS contenente 0,05% Tween 20 (250 microlitri/pozzetto).

La plastica è stata quindi saturata dispensando 200 microlitri di una soluzione al 2% di albumina bovina frazione V in PBS.

Dopo un'ulteriore incubazione di 18 ore a temperatura ambiente la piastra è stata lavata tre volte come precedentemente descritto ed asciugata a 37°C per 30 minuti.

Coniugazione dell'enzima perossidasi di rafano con l'anticorpo monoclonale Helix-1.

L'anticorpo monoclonale Helix-1 purificato da liquido ascitico è stato coniugato l'enzima perossidasi di rafano (HRP) utilizzando il metodo descritto da Nakane (Nakane, P.K. e Kawaoi, A. 1974, Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation, J. Histochem. Cytochem., 22, 1084).

Il procedimento utilizzato è stato il seguente: 4 mg di HRP (Sigma HRP tipo VI) vengono solubilizzati in 1 ml di ac-





qua distillata, quindi 0,1 ml di 0,1 M sodio metaperiodato in acqua sono stati aggiunti alla soluzione HRP. Dopo 20 minuti di incubazione al buio, la soluzione di HRP è stata dializzata contro 10 mM tampone sodio acetato a pH 4,5.

5 1 ml di anticorpo monoclonale purificato (1 mg/ml in 0,1M sodio bicarbonato) è stato aggiunto alla soluzione HRP, e la miscela ottenuta è stata incubata al buio per due ore.

 Alla miscela HRP-anticorpo sono stati successivamente aggiunti 100 microlitri di una soluzione di sodio boroidruro
10 (4 mg/ml in acqua).

 Dopo 2 ore di incubazione a 4°C, l'anticorpo coniugato con HRP viene purificato dalla miscela tramite precipitazione aggiungendo un ugual volume di una soluzione satura di solfato di ammonio.

15 Il precipitato, dopo lavaggio, è stato risospeso con 1 ml di PBS e 1 ml di glicerina e mantenuto a -20°C.

ELISA non competitivo eterogeneo per la ricerca dell'antigene.

 50 microlitri di campioni, controlli positivi e negativi, sono stati dispensati in duplicato nei pozzetti della piastra microtiter preparata precedentemente.
20

 In tutti i pozzetti sono stati aggiunti 50 microlitri di Helix-1 coniugato con HRP. Dopo 10 minuti di incubazione, i pozzetti sono stati lavati tre volte con PBS contenente
25 0,05% Tween 20.





Ad ogni pozzetto della piastra microtiter sono stati aggiunti 100 microlitri di soluzione cromogena contenente il substrato per l'enzima HRP (0,1M tampone sodio citrato, pH 4,7 contenente 1 mg/ml di urea perossido e 1 mg/ml di orto-fenilendiammina).

La reazione enzimatica è stata quindi bloccata dispensando in ogni pozzetto 50 microlitri di HCl 2N.

La densità ottica delle soluzioni colorate presenti nei pozzetti è stata determinata 490 nm usando un lettore di piastre microtiter.

In questo test ELISA di tipo non competitivo, maggiore è l'intensità di colore presente nei pozzetti della piastra microtiter maggiore è la quantità, nel campione analizzato, di antigene dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa dell'*Helicobacter pylori*.

ELISA competitivo eterogeneo per la ricerca dell'antigene.

L'antigene dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa dell'*Helicobacter pylori* oppure il sonicato crudo di *Helicobacter pylori* è stato fissato ai pozzetti della piastra microtiter (Nunc, Maxisorp) dispensando 0,2 ml di PBS contenente 2 μ g/ml di antigene o di cellule sonicate.

Dopo un'incubazione di 18 ore a temperatura ambiente, i pozzetti della piastra microtiter sono stati lavati 3 volte con 250 microlitri di PBS contenente 0,05% Tween 20.



La plastica è stata saturata come descritto in precedenza per il test ELISA non competitivo.

5 50 microlitri di controlli positivi, controlli negativi e campioni, e 50 microlitri Helix-1 coniugato con HRP sono stati dispensati in duplicato in ciascun pozzetto della piastra microtiter.

La miscela così formata viene mantenuta per 30 minuti a temperatura ambiente.

10 I pozzetti della piastra microtiter sono stati lavati per tre volte come descritto in precedenza.

La quantità legata alla fase solida di anticorpo Helix-1 coniugato con HRP è stata determinata come descritto per il test non competitivo.

15 In questo test immunoenzimatico di tipo competitivo, maggiore è l'intensità del colore presente nei pozzetti della piastra microtiter dopo la reazione enzimatica minore è la quantità, nel campione esaminato, di antigene dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa dell'*Helicobacter pylori*.

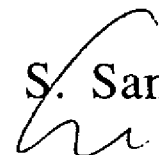
20



RIVENDICAZIONI

1. Un ibridoma (2H11) che produce un anticorpo monoclonale (Helix-1) che immunoreagisce con un antigene di *Helicobacter pylori* avente un apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa, il
5 detto ibridoma essendo identificato dal numero di deposito ECACC n.
2. Un anticorpo monoclonale (Helix-1) che immunoreagisce in modo specifico con un antigene di *Helicobacter pylori* che ha un apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa, ed è secreto
10 dall'ibridoma (2H11) secondo la rivendicazione 1.
3. Una molecola dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa di *Helicobacter pylori* presente in un qualsiasi tipo di campione, solido oppure liquido, quale indicatore della presenza del batterio *Helicobacter pylori* nella sede da cui il
15 detto campione proviene.
4. Molecola secondo la rivendicazione 3, in cui tale sede è rappresentata da un organismo, umano o animale, oppure dall'ambiente, ad esempio un alimento, oppure da una coltura in vitro a scopo diagnostico.
- 20 5. Molecola secondo una delle rivendicazioni 3 o 4, caratterizzata dal fatto che il suo peso molecolare, valutato mediante cromatografia ad esclusione molecolare, in condizioni non denaturanti, è compreso tra 400 e 600 kDa.
- 25 6. Molecola secondo una delle rivendicazioni da 3 a 5, caratterizzata dal fatto che essa è identificata in modo spe-





cifico ed univoco, tramite immunoreazione, da un anticorpo monoclonale (Helix-1) secreto da un ibridoma (2H11) identificato dal numero di deposito ECACC n.

5 7. Metodo per l'individuazione della presenza di una molecola secondo una delle rivendicazioni da 3 a 6, in un campione sia solido che liquido, caratterizzato dal fatto che esso viene effettuato tramite test chimico-fisici, ad esempio mediante cromatografia, o immunologici utilizzando anticorpi monoclonali e/o policlonali o frammenti immunologicamente attivi di essi oppure mediante reazioni di affinità
10 con altre molecole, ad esempio recettori cellulari, lectine, zuccheri, fosfolipidi, enzimi, peptidi ecc. .

8. Metodo secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto che esso comprende le seguenti fasi:

15 a) fornire un generico campione da analizzare tipicamente questo campione fornito come una data quantità di un mezzo solido che viene opportunamente trattato prima dell'analisi, come una sospensione ottenuta da un campione solido, oppure come un campione liquido;

20 b) fornire un anticorpo monoclonale e/o policlonale in un formato biologicamente attivo che immunoreagisca con l'antigene dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa di *Helicobacter pylori*;

c) miscelare il campione con l'anticorpo della fase b) per
25 formare una miscela di immunoreazione;



d) mantenere la miscela in condizioni opportune per favorire la reazione tra antigene e anticorpo per un periodo di tempo variante da pochi minuti ad ore;

5 e) accertare se sia verificata una reazione antigene-anticorpo e quindi stabilire se nel campione in esame era presente la molecola dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa di *Helicobacter pylori*, e determinarne eventualmente la sua concentrazione.

10 9. Metodo secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto che la presenza di antigene dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa di *Helicobacter pylori* in campioni sia liquidi che solidi viene accertata, sia tramite metodi di dosaggio immunologico di tipo competitivo che non competitivo.

15 10. Metodo secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto che la presenza di antigene dall'apparente peso molecolare di 16 ± 2 kDa di *Helicobacter pylori* in campioni sia liquidi che solidi viene accertata tramite metodi di dosaggio immunologico eterogeneo oppure tramite metodi di dosaggio immunologico omogeneo.

20 11. Uso dello specifico riconoscimento immunologico di un anticorpo monoclonale (Helix-1), oppure di suoi frammenti oppure di anticorpi monoclonali e/o policlonali o di frammenti di essi in grado di riconoscere in modo specifico tramite immunoreazione un antigene o molecola dall'apparente



peso molecolare di 16 ± 2 kDa per rilevare in un campione la presenza di *Helicobacter pylori*, oppure dell'antigene di 16 ± 2 kDa oppure di aggregati di antigene di 16 ± 2 kDa, oppure di frammenti di antigene di 16 ± 2 kDa.

- 5 12. Uso secondo la rivendicazione 11, caratterizzato dal fatto che il detto anticorpo monoclonale (Helix-1) è secreto dall'ibridoma (2H11) identificato dal numero di deposito ECACC n.

10

IL MANDATARIO

ing. S. Sandri

(N. Albo 460)

