

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902021263A1

Publication Date

20130809

Applicant

GEROSA GINO

Title

METODO PER LA RILEVAZIONE DI UNO XENOANTIGENE IN TESSUTI
FISSATI USATI COME SOSTITUTI BIOPROTESICI.

Descrizione del brevetto per invenzione industriale dal titolo:

Metodo per la rilevazione di uno xenoantigene in tessuti fissati usati come sostituti bioprotesici

Campo dell'invenzione

L'invenzione è relativa ad un metodo per la determinazione di uno xenoantigene, in particolare dell'epitopo α -Gal, in tessuti xenogenici fissati, in particolare fissati con glutaraldeide, impiegabili nella manifattura di sostituti bioprotesici per uso in campo clinico umano.

Stato della tecnica

Il settore delle bioprotesi è in rapida espansione sia per i progressi dell'ingegneria tissutale sia per i bisogni crescenti in campo sanitario che questi progressi sottendono. In questo senso è da considerarsi emblematico il settore cardiovascolare sia per l'impatto socio-sanitario che per la consolidata prassi della sostituzione delle valvole cardiache.

Le alterazioni a carico delle valvole cardiache hanno, infatti, un elevato impatto sulla popolazione mondiale avendo diverse cause eziologiche. Modificazioni dell'apparato valvolare indotte da patologie infiammatorie (come ad esempio malattie reumatiche), infettive (ad esempio endocardite) o degenerative (degenerazione mixoide, distrofia calcifica) possono tradursi in disfunzioni (stenosi o insufficienza) con grave compromissione della circolazione sanguigna, spesso incompatibili con la vita stessa. L'impatto di queste alterazioni sulla salute pubblica è anche correlato dal legame fra l'eziologia degenerativa ed il fenomeno inevitabile dell'invecchiamento della popolazione. Le stime epidemiologiche più recenti condotte in Europa e negli Stati Uniti [1] mostrano una prevalenza di stenosi aortica moderata-severa nel 4,6% della popolazione con età >75 anni, che arriva all'8,1% dopo gli 85 anni. La stenosi aortica, dal momento in cui diviene sintomatica o determina disfunzione ventricolare sinistra, è una malattia con prognosi infausta a breve termine.

La scoperta negli anni '60 della "macchina cuore-polmone" ha permesso, attraverso l'utilizzo della circolazione extracorporea, il blocco temporaneo della funzione cardiaca, rendendo possibile interventi chirurgici sul muscolo cardiaco

non in movimento. La tecnologia biomedica si è trovata in grado quindi di sviluppare ed applicare chirurgicamente a scopi sostitutivi protesi valvolari capaci di imitare la funzione di apertura e chiusura di valvole native disfunzionanti. Al momento la sostituzione valvolare è la terapia elettiva in quanto l'unica in grado di modificare la prognosi e migliorare significativamente la qualità di vita.

La protesi valvolare ideale dovrebbe consentire un flusso transvalvolare sovrapponibile a quello della corrispondente valvola originale sana, garantire una lunga durata e non generare effetti emolitici o trombogenici. Poichè tali caratteristiche sono complessivamente difficili da ottenere condensate in unico dispositivo, le protesi valvolari cardiache attualmente in commercio sono il frutto di costanti modifiche e migliorie tuttora in essere. Le attuali protesi, disponibili a scopo clinico, vengono suddivise in meccaniche, biologiche e homograft.

Generalmente, le protesi meccaniche non vanno incontro ad alcuna degenerazione nel tempo, tuttavia necessitano di terapia anticoagulante. Non possono essere ripopolate da cellule, in quanto non offrono un supporto biologico che favorisca un attecchimento cellulare. Questo compromette la possibilità di un rimodellamento strutturale e quindi, ad esempio, un incremento delle dimensioni in relazione alla crescita corporea del paziente. Possono durare fino intorno ai 20 anni, oltre i quali necessitano di essere sostituite a causa della formazione di panni fibrosi incompatibili con la motilità dei lembi.

Con homograft si intendono invece, sostituti valvolari non xenogenici prelevati in sede autoptica da cuori non idonei a trapianto d'organo appartenenti a individui tra i 18 e 65 anni. Comprendono un tratto di circa 5-6 cm di aorta ascendente o arteria polmonare e l'anulus fibroso proprio della valvola. I vantaggi di tali bioprotesi una volta impiantate, sono dati dal loro eccellente profilo emodinamico e dal basso rischio tromboembolico e di infezione. Gli homograft, inoltre, non necessitano di terapia anticoagulante. Questi tipi di bioprotesi, però, hanno una durata limitata: la degenerazione per fenomeni di distrofia calcifica degli homograft incrementa in maniera inversamente proporzionale con l'età del ricevente (questo aspetto è dovuto ad una maggiore mobilitazione fisiologica di calcio che nei pazienti pediatrici e di giovane età è associata allo sviluppo dell'apparato scheletrico). Inoltre, l'elevato numero di degenze che necessitano di un intervento

di sostituzione valvolare e la bassa disponibilità di tali protesi biologiche (in quanto ottenute da donatori deceduti), rende il loro numero insufficiente a soddisfare la richiesta clinica.

Stante questi problemi, i sostituti valvolari più usati sono protesi biologiche derivate da tessuti xenogenici, in particolare derivate da valvole di maiale o da pericardio bovino o equino. Tali bioprotesi possono essere prodotte sia con l'ausilio di un supporto semi-rigido sostenente il cerchione fibroso ed utilizzato come ancoraggio nelle operazioni di sutura della protesi (stented), sia senza tale supporto (stentless). Il loro flusso risulta fisiologicamente simile a quello di una valvola nativa, non necessitano di terapia anticoagulante, ma hanno lo svantaggio di andare incontro a processi degenerativi di distrofia calcifica (bioprotesi porcine), degenerazione con rottura delle cuspidi (protesi pericardiche) e dimostrano una maggior sensibilità verso infezioni endocardiche. Vengono usualmente trattate con agenti chimici, come la glutaraldeide, allo scopo di migliorarne le caratteristiche meccaniche, diminuirne l'antigenicità tissutale intrinseca e permetterne la conservazione.

Possono essere trattate anche con protocolli di decalcificazione (volti alla diminuzione del rischio di deposito di cristalli di idrossiapatite dopo l'impianto) o detossificazione, attraverso la saturazione di siti aldeidici della glutaraldeide eventualmente ancora reattivi. Le bioprotesi, sia di origine suina che pericardica bovina, sono state suddivise in bioprotesi di I° generazione (tessuti fissati con glutaraldeide ad alta pressione) e II° generazione (glutaraldeide a bassa pressione con l'aggiunta di surfattanti bloccanti i siti di legame per il calcio); entrambe hanno una durata media di 10-14 anni.

Come precedentemente accennato, le protesi valvolari di tipo biologico (ad eccezione degli homograft) sono tutte costituite da tessuti di origine xenogenica. Per tessuto xenogenico si intende un tessuto che appartiene ad un organismo di specie differente dall'uomo; tali materiali posseggono antigeni di superficie specifici e tollerabili all'interno della stessa specie d'origine, ma incompatibili nel caso di impianto nell'uomo dove, se non adeguatamente trattati, scatenerebbero l'attivazione della cascata del complemento con aggregazione piastrinica, generando una situazione simile a quella che si verifica nel caso di incompatibilità

tra gruppi sanguigni, il tutto in una trentina di minuti. Tale meccanismo è conosciuto con il nome di rigetto iperacuto. Il principale responsabile di tale drammatico meccanismo di rigetto è lo xenoantigene α -Gal. Questo epitopo è un di-galattoside (galattosio- α 1-3-galattosio) presente sulle glico-proteine e sui glico-lipidi di membrana, principalmente di cellule endoteliali, ma è stato rinvenuto anche su tipi cellulari quali monociti, granulociti [2] e globuli rossi [3] ed in importanti distretti tissutali come miocardico [4] e osso [5]. L'epitopo α -Gal è costitutivamente espresso in tutti i mammiferi, ad eccezione dei primati superiori e dell'uomo [6] il quale, a causa di mutazioni avvenute durante il processo evolutivo, non è in grado di sintetizzare l'enzima α -1,3-galattosil-transferasi, responsabile dell'attacco dell'epitopo sulle glico-proteine e glico-lipidi di membrana delle componenti cellulari. L'uomo inoltre, fin dalla nascita, esprime anticorpi diretti contro tale antigene come risultato di una continua stimolazione da parte della flora batterica intestinale (*Escherichia coli*, ma rinvenuto anche in esemplari come *Klebsiella pneumonia* e *Serratia marcescens*) [6]. L' 1-3% di tutte le IgG circolanti sono specificatamente anticorpi anti α -Gal.

Fino ad oggi, la biocompatibilità dei tessuti xenogenici destinati alla fabbricazione di bioprotesi valvolari è ottenuta attraverso il trattamento con la già citata glutaraldeide. Tale agente chimico, nello specifico, è un'aldeide bifunzionale a 5 atomi di carbonio introdotta nelle pratiche biomediche sul finire degli anni '60; reagisce con i gruppi ϵ -amino dei residui di lisina inducendo la formazione di una rete di legami chimici volti a stabilizzare i tessuti, impedire la degradazione enzimatica degli stessi e mascherare gli antigeni superficiali cellulari nei confronti del sistema immunitario del ricevente.

Nonostante tale trattamento, l'epitopo α -Gal è stato dimostrato (solo qualitativamente e limitatamente alla singola componente cellulare) permanere in maniera reattiva nelle bioprotesi valvolari commercializzate [7], determinando dopo l'impianto, un aumento degli anticorpi anti α -Gal circolanti sia in pazienti pediatriche che in adulti [8]. Inoltre, il complesso antigene-anticorpo che viene a formarsi sembra sia direttamente coinvolto nella promozione della deposizione di sali di calcio [9] favorendo la formazione di episodi di distrofia calcifica della valvola.

Recentemente gli inventori hanno messo a punto un test immunologico di tipo ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) per determinare la quantità di epitopi α -Gal sia in tessuti xenogenici freschi e dopo trattamento decellularizzante, volto all'individuazione di una procedura in grado di rimuovere eventuali xenoantigeni α -Gal presenti nel tessuto nativo [10].

Rimane però irrisolto il problema di determinare quantitativamente tale epitopo in tessuti fissati, in particolare con glutaraldeide, ed utilizzati in prevalenza per la manifattura di bioprotesi.

Uno scopo della presente invenzione è, quindi, la messa a punto di un metodo per la rilevazione dello xenoantigene α -Gal in tessuti fissati al fine di poter disporre di uno strumento di controllo in grado di garantire e validare la produzione di tessuti " α -Gal free" destinati alla produzione di bioprotesi per uso clinico.

Sommario

Per lo scopo predetto gli inventori hanno messo a punto un nuovo metodo per la determinazione dell'epitopo α -Gal in tessuti fissati, apportando modifiche al metodo per la determinazione di tale antigene mediante l'uso di un anticorpo monoclonale (prodotto in topo) sviluppato su tessuti freschi non fissati.

Per rendere possibile la determinazione del suddetto antigene in tessuti fissati, è, infatti, necessario inattivare i gruppi reattivi liberi della glutaraldeide che potrebbero interagire con l'anticorpo monoclonale anti α -Gal, generando falsi positivi. Tale inattivazione può essere garantita attraverso un trattamento del tessuto da analizzare con acido omocisteico.

In un primo aspetto è quindi oggetto della presente invenzione un metodo per la determinazione dello xenoantigene α -Gal in tessuti fissati, tale metodo comprendente almeno le fasi di:

- sottoporre un campione del tessuto fissato ad un trattamento detossificante con acido omocisteico;
- rilevare l'epitopo α -Gal mediante un saggio immunologico ELISA con un anticorpo monoclonale anti α -Gal;
- determinare l'epitopo α -Gal mediante rilevazione per assorbanza a 450nm del segnale generato da detto anticorpo monoclonale libero e comparazione con una retta di taratura.

È ancora oggetto dell'invenzione il kit per l'esecuzione del metodo di determinazione dello xenoantigene α -Gal in tessuti fissati da impiegarsi come sostituti bioprotesici.

Il metodo e le sue possibili realizzazioni, come pure i vantaggi dello stesso, saranno chiariti dalla descrizione dettagliata dell'invenzione che segue e con l'ausilio degli esempi di realizzazione dello stesso forniti a scopo illustrativo e non limitativo dell'invenzione.

Breve descrizione delle figure

Figura 1: retta di taratura che mette in relazione i diversi μ g di anticorpo monoclonale primario anti α -Gal legati durante l'incubazione (asse delle ordinate) con il logaritmo delle corrispondenti diverse concentrazioni di globuli rossi di coniglio (asse delle ascisse) utilizzate. Ogni globulo rosso, come indicato da letteratura, esprime 2×10^6 epitopi α -Gal sulla sua superficie.

Figura 2: valutazione del grado di saturazione del fondo della piastra ottenuto attraverso coating effettuati con tre differenti tamponi. L'asse delle ascisse riporta le differenti diluizioni della preparazione originale di anticorpo monoclonale primario anti α -Gal utilizzata: [1:100] – [1:50] - [1:30] - [1:20], quello delle ordinate le diverse assorbanze ottenute tramite lettura a 450 nm. PBS: tampone fosfato, CBC: tampone carbonato/bicarbonato, TBS: tampone Tris/NaCl.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Il metodo di determinazione dell'epitopo α -Gal secondo l'invenzione è applicabile ad una vasta gamma di sostituti bioprotesici in uso in campo clinico umano, ed in particolare a sostituti bioprotesici derivati da tessuti di origine porcina e pericardica bovina ed equina, fissati in glutaraldeide secondo le procedure proprie di ogni azienda produttrice.

Il metodo oggetto dell'invenzione che comprende almeno le fasi di:

- sottoporre un campione del tessuto fissato ad un trattamento detossificante con acido omocisteico;
- rilevare l'epitotopo α -Gal mediante un saggio immunologico ELISA con l'anticorpo monoclonale anti α -Gal;

- determinare l'epitopo α -Gal mediante rilevazione per assorbanza a 450nm del segnale generato dall'anticorpo monoclonale libero e comparazione con una retta di taratura;

può opzionalmente comprendere, prima della determinazione dell'epitopo α -Gal, l'ulteriore fase di:

- produrre la retta di taratura mediante l'utilizzo di globuli rossi di coniglio per la determinazione quantitativa dell'epitopo α -Gal dopo rilevazione per assorbanza a 450 nm del segnale generato dall'anticorpo monoclonale anti α -Gal libero.

Il metodo può essere effettuato in una sua realizzazione secondo il protocollo di cui di seguito si descrivono le condizioni essenziali:

- preparazione di un campione del tessuto fissato con glutaraldeide e suo trattamento detossificante con una soluzione di acido omocisteico in tampone fosfato (PBS) ad un pH compreso tra 6.0 – 8.0 ed ad una concentrazione compresa tra 50mM e 200mM (limite di saturazione); preferibilmente la concentrazione dell'acido omocisteico è 100mM;
- saggio immunologico mediante tecnica ELISA sul campione detossificato dopo incubazione con l'anticorpo monoclonale anti α -Gal.

L'anticorpo monoclonale primario anti α -Gal per il saggio ELISA è un anticorpo monoclonale che può essere prodotto ad esempio in topo mediante immunizzazione con globuli rossi di coniglio. Tale anticorpo, appartenente alla famiglia delle IgM, possiede una caratteristica struttura pentamerica che permette la creazione di immunocomplessi di grandi dimensioni separabili per centrifugazione. I termini anticorpo monoclonale e anticorpo anti α -Gal qui usati identificano in ogni caso un anticorpo monoclonale diretto esclusivamente contro l'epitopo α -Gal. L'anticorpo monoclonale anti α -Gal impiegabile per il metodo è preferibilmente da topo e l'anticorpo policlonale secondario è preferibilmente da coniglio anti-topo e coniugato con l'enzima perossidasi.

Il metodo oggetto dell'invenzione è stato messo a punto con l'anticorpo monoclonale anti α -Gal commercializzato da Axxora (Nottingham, UK) ed identificato come M86, che è da preferirsi, benché il metodo stesso non possa nè

essere vincolato nè limitato al suddetto prodotto commerciale contenente tale anticorpo monoclonale anti α -Gal nella sua attuazione.

Nell'esecuzione del test è preferibile effettuare il coating della piastra (per coating si intende la copertura del fondo dei pozzetti) con 50 μ l per pozzetto di α -Gal/albumina serica umana (HSA) o con α -Gal/albumina serica bovina (BSA). E' tuttavia preferibile utilizzare l'albumina serica umana in quanto la sua alternativa bovina, contenente costitutivamente epitopi α -Gal, aumenta il rumore di fondo riscontrabile nel momento della lettura allo spettrofotometro. Tali soluzioni (α -Gal/HSA o α -Gal/BSA) sono utilizzate ad una concentrazione compresa di 2.5 - 15 μ g/ml. Preferenzialmente viene utilizzata la concentrazione di 5 μ g/ml.

Per la costituzione della soluzione di coating possono essere utilizzati i seguenti tamponi: tampone fosfato (PBS) [136 mM NaCl, 2 mM KCl, 4 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4], pH 7.0-8.0; tampone carbonato/bicarbonato (CBC) [35 mM NaHCO_3 , 15 mM NaCO_3] pH 9.0-10.0; tampone Tris/NaCl (TBS) [50 mM Tris, 0.9% NaCl], pH 7.0-8.0. Si ottiene tuttavia una migliore saturazione della piastra con l'utilizzo dei tamponi CBC e TBS, che sono quindi da preferirsi al tampone PBS. La saturazione ottimale si raggiunge con il tampone TBS, che quindi è preferibile da usare in alternativa al CBC.

In una realizzazione preferita il metodo oggetto dell'invenzione prevede che le diverse fasi siano eseguite alle condizioni di seguito descritte in dettaglio.

Preparazione campioni del tessuto fissato e trattamento con acido omocisteico

Campioni di tessuto prelevati dalla bioprotesi da analizzare sono lavati velocemente con tampone fosfato (PBS) sterile per eliminare l'eccesso di glutaraldeide presente nella soluzione di conservazione ed incubati con 100 mM di acido omocisteico in PBS sterile (pH 6,0 – 8,0). Tale incubazione è eseguita con due passaggi di 12 ore ciascuno (con relativa sostituzione del tampone con soluzione fresca dopo le prime 12 ore) sotto costante agitazione, al buio e a temperatura ambiente, preferibilmente compresa tra 15 e 20 °C.

Il campione viene quindi lavato attraverso due passaggi di 15 minuti ciascuno in PBS sterile (pH 7.0 – 8.0) a temperatura ambiente. Asciugato rapidamente su carta da filtro speciale e pesato su bilancia analitica.

Il trattamento di materiale biologico con acido omocisteico, prima del test ELISA, è definito detossificante in quanto volto alla saturazione dei residui chimici della glutaraldeide non coniugati ed ancora reattivi, in grado perciò di interagire con l'anticorpo monoclonale anti α -Gal utilizzato successivamente per l'individuazione dei gruppi α -Gal e quindi di generare falsi positivi.

Saggio ELISA: incubazione con anticorpo monoclonale anti α -Gal

Ogni campione viene contrassegnato e tagliato in piccoli pezzi di peso compreso tra 30 e 50 mg, aggiunto dell'aliquota di anticorpo monoclonale anti α -Gal [1:50] v/v in PBS sterile e lasciato incubare sotto moderata agitazione a 37°C per 2 ore (volume finale compreso tra 1.5 e 2.5 ml). Successivamente il campione viene centrifugato a 14.340 g per 30 minuti a +4°C.

Saggio ELISA: preparazione dei pozzetti della piastra

Su una piastra a 96 pozzetti si effettua un rivestimento (coating) con 50 μ l per pozzetto di α -Gal/albumina serica umana (HSA) a 5 μ g/ml in tampone TBS (pH 7.0 – 8.0). La piastra è successivamente coperta con pellicola protettiva per evitare eventuali fenomeni di evaporazione, e incubata per 90 minuti a 37°C al buio. Vengono quindi effettuati 3 lavaggi con 250 μ l per pozzetto di PBS sterile (pH 7.4) a temperatura ambiente. Il primo lavaggio è lasciato agire per 5 minuti, i due successivi per 3 minuti.

Il blocking (procedura indispensabile nelle tecniche ELISA per rendere inerte la plastica, nello specifico vengono ad essere saturate micro-aree del fondo del pozzetto eventualmente rimaste libere dalla procedura di coating) è effettuato con 250 μ l per pozzetto di 1.5 % p/v di HSA in PBS sterile, seguito dalla copertura della piastra con pellicola protettiva e incubazione per 2 ore a temperatura ambiente, al buio. Successivamente si eseguono 3 lavaggi con PBS sterile come sopra.

Preparazione della retta di taratura con diverse concentrazioni di eritrociti di coniglio

Gli eritrociti sono isolati da sangue intero di coniglio mediante metodica classica, risospesi in soluzione isotonica sterile (pH 7.4) a 4°C e contati attraverso una camera di Burker. La retta di taratura è sviluppata con undici diverse concentrazioni (esprese come n° di globuli rossi / 2 ml) di globuli rossi; 30.5×10^6 ,

16×10^6 , 8×10^6 , 4×10^6 , 2×10^6 , 1×10^6 , 0.4×10^6 , 0.2×10^6 , 0.1×10^6 , 0.05×10^6 e 0.025×10^6 . Si preparano quindi undici provette contenenti le differenti concentrazioni (2 ml finali) e si incubano con la preparazione originale diluita dell'anticorpo monoclonale anti α -Gal [1:50] v/v in PBS sterile per 2 ore a 37°C sotto costante agitazione. Successivamente le provette sono centrifugate a 14.340 g per 30 minuti a +4°C.

Saggio ELISA: determinazione dell'antigene α -Gal

Per ogni singolo pozzetto vengono aggiunti 100 μ l di surnatante, prelevati da ogni campione da analizzare e da ogni soluzione a diversa concentrazione di globuli rossi. Il carico in piastra viene eseguito occupando i pozzetti di un'intera colonna per ogni campione, con copertura della piastra con pellicola protettiva e incubazione per tutta la notte a 4°C al buio. Vengono quindi effettuati 3 lavaggi con PBS sterile come sopra ed aggiunti 100 μ l per pozzetto di una soluzione di anticorpo secondario (policlonale da coniglio anti-mouse) coniugato all'enzima perossidasi [1:500] v/v in PBS sterile; la piastra è quindi coperta con pellicola protettiva ed incubata a 37°C al buio per 2 ore. Si eseguono 3 lavaggi con PBS sterile come sopra. Si aggiungono 100 μ l per pozzetto di una soluzione di sviluppo per l'enzima perossidasi (o-fenilendiammina 200 μ mol in tampone fosfato-citrato e sodio perborato), a cui fanno seguito la copertura della piastra con pellicola protettiva e l'incubazione per 30 minuti al buio. Segue lettura della piastra in un lettore di piastre a 450 nm per rilevare l'anticorpo libero.

Il saggio sviluppato è, infatti, di tipo indiretto: il campione da analizzare viene incubato con una quantità nota di anticorpo primario monoclonale anti α -Gal (anticorpo monoclonale esclusivamente diretto contro l'epitopo α -Gal). L'immunocomplesso creatosi viene separato per centrifugazione. Si effettua quindi il dosaggio sull'anticorpo rimasto libero in soluzione. Per differenza è possibile risalire alla quantità di anticorpo legato all'antigene. Tale test è reso possibile grazie alla comparazione tra una quantità nota di epitopi α -Gal derivati da una fonte standard costituita da globuli rossi di coniglio (2×10^6 epitopi/globulo rosso), e la quantità rilevata nelle bioprotesi.

La formula di conversione per risalire al numero di epitopi α -Gal partendo dall'analisi di un campione biologico è stata estrapolata dalle medie ottenute dalla

costruzione di 3 curve di taratura con undici diverse concentrazioni di globuli rossi di coniglio condotte ognuna in triplo.

La formula matematica risultante è:

$$n^{\circ} \text{ epitopi} = 10^{\left(\frac{\text{ng Abl} + 0.2071}{0.1496} \right)} * 2 * 10^9$$

dove:

- **µg Abl** corrispondono ai microgrammi di anticorpo monoclonale primario (Abl) che si sono legati al campione durante le 2 ore di incubazione a 37°C al buio. Tale quantità è determinabile attraverso una comparazione tra l'assorbanza generata da una quantità nota di anticorpo monoclonale anti α-Gal prima e dopo incubazione con il campione sapendo che ogni µl di soluzione anticorpale madre utilizzata contiene 0.015µg di anticorpo monoclonale. La formula è stata estrapolata dalla retta di taratura fornita in Figura 1, ottenuta come descritto in precedenza, ed è da ritenersi applicabile per quantità anticorpali comprese tra 0.005 µg e 0.47 µg.

Pertanto, in una sua realizzazione il metodo oggetto della presente invenzione può comprendere le fasi di:

- trattare un campione di tessuto per incubazione con una soluzione di acido omocisteico in tampone per 12 ore x 2 volte sotto agitazione, al buio ed a temperatura ambiente;
- incubare il campione precedentemente trattato con l'anticorpo monoclonale anti α-Gal primario per 2 ore a 37°C;
- centrifugare il campione a 14.340 g per 30 minuti a 4°C e separare il surnatante;
- trattare per il coating una piastra a pozzetti con una soluzione tamponata di α-Gal/albumina serica;
- lavare i pozzetti con un tampone e trattarli per il blocking con una soluzione tamponata di albumina serica al 1,5 % p/v per 2 ore a temperatura ambiente;
- lavare i pozzetti con tampone, caricare il surnatante del campione centrifugato in precedenza e incubare per tutta la notte a 4°C;

- lavare i pozzetti con tampone e caricare l'anticorpo secondario policlonale anti-topo coniugato all'enzima perossidasi ed incubare per tutta la notte a 4°C;
- lavare con tampone, caricare i pozzetti con la soluzione di sviluppo e incubare al buio per 30 minuti;
- eseguire la lettura della piastra con un lettore di piastre con rilevazione per assorbanza a 450 nm del segnale dell'anticorpo monoclonale libero.

In una sua realizzazione preferita tale metodo per la determinazione dello xenoantigene α -Gal in tessuti fissati con glutaraldeide comprende le seguenti fasi:

- trattamento del campione di tessuto da analizzare per incubazione con acido omocisteico preferenzialmente alla concentrazione di 100 mM, pH 6.0–8.0, in tampone fosfato per 12 ore x 2 volte sotto agitazione, al buio ed a temperatura ambiente;
- incubazione del campione precedentemente trattato con l'anticorpo primario monoclonale anti α -Gal per 2 ore a 37°C;
- centrifugazione del campione a 14.340 g per 30 minuti a 4°C e separazione del surnatante;
- coating di una piastra a pozzetti con 50 μ l per pozzetto di α -Gal/albumina serica umana (HSA) a 5 μ g/ml in tampone TBS (pH 7.0 – 8.0);
- lavaggi dei pozzetti con PBS e blocco con 1,5 % HSA in PBS per 2 ore a temperatura ambiente;
- lavaggio dei pozzetti con PBS e carico di 100 μ L del surnatante del campione centrifugato in precedenza per pozzetto e incubazione per tutta la notte a 4°C.
- lavaggi dei pozzetti con PBS e carico dell'anticorpo secondario policlonale anti-topo coniugato all'enzima perossidasi e incubazione per tutta la notte a 4°C;
- lavaggi con PBS e carico di 100 μ L della soluzione di sviluppo e incubazione al buio per 30 minuti;
- lettura della piastra con un lettore di piastre con rilevazione per assorbanza a 450nm del segnale dell'anticorpo libero.

Per l'applicazione del metodo di determinazione dell'epitopo α -Gal a tessuti fissati con glutaraldeide, in grado di garantire e validare la produzione di tessuti " α -Gal free" destinati alla produzione di bioprotesi per uso clinico, ha richiesto l'identificazione di condizioni adeguate a non determinare falsi positivi/negativi. Rispetto al metodo applicabile a tessuti freschi le differenze sostanziali sono:

- lo sviluppo di una nuova metodica che vede l'utilizzo di acido omocisteico alla concentrazione preferibile di 100 mM e a pH 6.0 – 8.0, per la saturazione dei gruppi della glutaraldeide in grado di generare falsi positivi a seguito dell'interazione con l'anticorpo monoclonale primario anti α -Gal;
- l'impiego di α -Gal/HSA nella soluzione di coating per incrementare la sensibilità della rilevazione dell'epitopo mediante l'eliminazione del rumore di fondo;
- l'impiego di una nuova soluzione di coating costituita da tampone TBS in grado di aumentare l'efficienza di legame della α -Gal/HSA sul fondo della piastra;
- l'impiego di una nuova soluzione di coating costituita da tampone CBC in grado di aumentare l'efficienza della α -Gal/HSA sul fondo della piastra per concentrazioni anticorpali di anticorpo primario monoclonale anti α -Gal fino a [1:50] v/v (vedi Figura 2).

In un secondo aspetto, l'invenzione concerne la messa a punto di un kit per l'esecuzione del metodo di determinazione dell'epitopo α -Gal a tessuti fissati con glutaraldeide che comprende almeno:

- un primo contenitore contenente una soluzione di acido omocisteico;
- un secondo contenitore contenente l'anticorpo primario monoclonale anti α -Gal, preferibilmente anti-topo;
- un ulteriore contenitore contenente un anticorpo secondario policlonale coniugato all'enzima perossidasi, preferibilmente da coniglio antitopo;
- libretto di istruzioni riportante la retta di taratura predisposta con concentrazioni note di globuli rossi di coniglio e la formula di conversione per il calcolo del numero di epitopi nel tessuto analizzato in base all'assorbanza del campione letta in piastra a 450 nm.

Preferibilmente, il kit può ulteriormente essere fornito di:

- un contenitore con il tampone di coating consistente in una soluzione di α -Gal/albumina serica in un tampone;
- un contenitore con il tampone di blocking consistente in una soluzione di albumina serica in un tampone;
- una soluzione per lo sviluppo dell'enzima perossidasi.

L'uso previsto del kit è per il controllo di qualità di tutti quei tessuti biologici fissati (ad esempio con glutaraldeide) utilizzabili per la fabbricazione di protesi applicabili ad uso clinico umano.

Come sarà più evidente di seguito negli esempi riportati per valutare l'effettiva azione del trattamento con acido omocisteico, è stato utilizzato del tessuto porcino knock-out per l'antigene α -Gal (il gene responsabile dell'espressione dell'epitopo viene ad essere silenziato attraverso una modificazione genetica). Tale tessuto non fissato, incubato con l'anticorpo monoclonale anti α -Gal, non genera alcun segnale in quanto mancante dell'antigene.

L'applicazione del test sullo stesso tessuto dopo fissazione con glutaraldeide, genera risultati positivi e molto variabili (falsi positivi). A seguito del trattamento con acido omocisteico i risultati ottenuti dal tessuto knock-out fissato con glutaraldeide, sono comparabili a quelli del tessuto originale non fissato, nello specifico non vi è nessun segnale da parte dell'anticorpo monoclonale anti α -Gal.

La possibilità di applicare tale test a sostituti protesici biologici fissati fornisce uno strumento di screening che privilegia i modelli in grado di dimostrare o che dimostreranno l'ottenimento di una completa schermatura o inattivazione dello xenoantigene α -Gal. Tali bioprotesi possono garantire una migliore biocompatibilità e una minore disponibilità all'insorgenza di fenomeni di infiammazione e distrofia calcifica.

Attualmente, patch di tessuto xenogenico sono utilizzate per la ricostruzione e riparazione di distretti tissutali non limitati all'ambito delle valvole cardiache; a questo scopo è utile citare CorMatrix® (patch per interventi e ricostruzioni nell'ambito cardiovascolare), Dynamatrix® (per interventi nel campo dell'odontoiatria), SurgiSIS® Ophtalmics (utilizzati nell'ambito della chirurgia oculare), AxoGuard® Nerve Connector (impiego nell'ambito della connessione chirurgica tra nervi), Matristem® (utilizzato nella riparazione di ulcere).

Il test può trovare quindi applicazione come controllo di qualità per tutti i tessuti xenogenici utilizzati nell'ambito dell'ingegneria tissutale e non solo in campo cardiaco come sostituti valvolari.

ESEMPI

In tutti gli esempi di seguito riportati il saggio ELISA è stato condotto con l'anticorpo monoclonale primario anti α -Gal commercializzato da Axxora (Nottingham, UK) identificato come M86.

Esempio 1: determinazione dell'epitopo α -Gal in un tessuto porcino α -Gal knock-out fresco.

Il pericardio knock-out è stato trasportato in laboratorio in soluzione isotonica fredda (PBS, 4°C a pH 7.4) con l'aggiunta di 1% di antibiotici (penicillina e streptomicina). Tutte le operazioni condotte sul campione sono state effettuate garantendo le condizioni di sterilità. In laboratorio il sacco pericardico è stato steso su un piano e la componente lipidica è stata separata meccanicamente dalla superficie epi-pericardica, quindi il tessuto è stato sottoposto ad un breve lavaggio in buffer fosfato sterile (PBS, 4°C a pH 7.0 – 8.0). Il sacco pericardico è stato tagliato in campioni più piccoli dal peso di circa 40 mg, i quali sono soggetti a due passaggi di 15 minuti ciascuno in PBS per eliminare eventuali residui di sangue.

Successivamente ogni campione (n=6) è stato sottoposto ad un blotting su carta da filtro e pesato accuratamente, prima di essere sottoposto al test ELISA. Tale campione è stato indicato come "Pericardio porcino KO".

I risultati ottenuti sono riportati in tabella 1.

Esempio 2: determinazione dell'epitopo α -Gal in un tessuto porcino α -Gal knock-out fissato con glutaraldeide

Il pericardio knockout è stato trasportato in laboratorio in soluzione isotonica fredda (PBS, 4°C a pH 7.0 – 8.0) con l'aggiunta di 1% di antibiotici (penicillina e streptomicina). Tutte le operazioni condotte sul campione sono state effettuate garantendo le condizioni di sterilità. In laboratorio il sacco pericardico è stato steso su un piano e la componente lipidica è stata separata meccanicamente dalla superficie epi-pericardica, quindi il tessuto è stato sottoposto ad un breve lavaggio in PBS. Il sacco pericardico è stato tagliato in campioni più piccoli dal peso di circa

40 mg, i quali sono soggetti a due passaggi di 15 minuti ciascuno in PBS per l'eliminazione di eventuali residui di sangue.

La fissazione in glutaraldeide è avvenuta secondo la procedura illustrata da Stacchino C e colleghi [11] che prevede incubazioni di tre giorni ciascuna in soluzioni di glutaraldeide a concentrazione crescente fino allo 0.5% (3 giorni di incubazione per ogni step di concentrazione 0.1%-0.2%-0.3%-0.4%-0.5%).

Successivamente ogni campione (n=6) è stato sottoposto ad un blotting su carta da filtro e pesato accuratamente, prima di essere sottoposto al test ELISA. Tale campione è stato indicato come "Pericardio porcino KO F".

Parte dei campioni fissati, dopo la procedura di fissazione con glutaraldeide, sono stati sottoposti a trattamento detossificante. Si è proceduto quindi alla loro incubazione con acido omocisteico alla concentrazione di 100mM in tampone fosfato per 12 ore x 2 volte sotto agitazione, al buio ed a temperatura ambiente. Successivamente ogni campione (n=6) è stato sottoposto ad un blotting su carta da filtro e pesato accuratamente, prima di essere sottoposto al test ELISA. Tale campione è stato indicato come "Pericardio porcino KO F-DETOX".

I risultati ottenuti dalla determinazione dell'epitopo α -Gal all'esempio 1 e 2 sono riportati in tabella 1, espressi come numero di epitopi α -Gal $\times 10^{10}$ /10 mg di tessuto umido in pericardio porcino α -Gal-knock-out (KO, n=6), pericardio porcino α -Gal-knock-out dopo sola fissazione in glutaraldeide (KO F, n=6) e pericardio porcino α -Gal-knock-out dopo fissazione in glutaraldeide e detossificazione (KO F-DETOX, n= 6).

Tabella1

	Numero di epitopi $\times 10^{10}$ ogni 10 mg di tessuto umido
Pericardio porcino KO	0.0001 $\pm$ 0.15
Pericardio KO F	1.56 $\pm$ 0.95
Pericardio porcino KO F-DETOX	0.001 $\pm$ 0.4

Dai risultati si evidenzia che il trattamento detossificante con acido omocisteico nelle condizioni indicate è un passaggio fondamentale ed insostituibile per poter effettuare un'indagine affidabile e riproducibile volta alla determinazione dell'epitopo α -Gal su campioni tissutali precedentemente fissati in glutaraldeide.

Esempio 3: determinazione dell'epitopo α -Gal in bioprotesi valvolari aortiche commerciali ottenute da tessuto porcino o bovino fissato con glutaraldeide

Tutte le manipolazioni di materiale bioprotesico sono state effettuate rispettando le condizioni di sterilità. Ogni bioprotesi è stata estratta dalla relativa confezione e sottoposta a 3 lavaggi in buffer fosfato (PBS, 20°C a pH 7.0 – 8.0) come espressamente indicato dal “Manuale di Istruzioni Pre-impianto” fornito dalla ditta produttrice. Successivamente sono stati isolati i lembi e sottoposti a trattamento detossificante mediante incubazione con acido omocisteico alla concentrazione di 100mM in tampone fosfato per 12 ore x 2 volte sotto agitazione, al buio ed a temperatura ambiente. Ogni campione è stato quindi sottoposto ad un blotting su carta da filtro e pesato accuratamente, prima di essere sottoposto al test ELISA.

I risultati espressi come media $\pm$ deviazione standard del numero di epitopi $\times 10^{10}$ /10 mg di tessuto umido sono riportati in tabella 2. La significatività tra i campioni è stata determinata attraverso il test ANOVA a una via. Le differenze sono considerate significative con $p < 0.05$.

Tabella 2

BIOPROTESI	ORIGINE	NUMERO DI EPITOP
modello 1 n=6	Pericardo bovino	$6.62 \times 10^{10} \pm 0.43$
modello 2 n=3	Pericardio bovino	$5.9 \times 10^{10} \pm 0.7$
modello 3 (TAVI*) n=3	Pericardio bovino	$6.3 \times 10^{10} \pm 0.7$
modello 4 n=3	Pericardio bovino	$5.2 \times 10^{10} \pm 0.67$
modello 5 n=9	Valvola porcina	$5.02 \times 10^{10} \pm 0.68$

*TAVI (Transcatheter Aortic Valve Implantation) protesi aortica impiantabile per via percutanea o trans apicale.

Esempio 4: Valutazione del tampone di coating nel garantire un miglior legame della proteina serica con il fondo della piastra.

La molecola responsabile del legame tra la plastica costituente il fondo dei vari pozzetti e il residuo α -Gal è l'albumina serica (sia essa umana o bovina). Il

legame avviene attraverso interazioni di carica tra la plastica e la proteina stessa. Il tampone in cui viene ad essere disciolta la soluzione di coating è in grado di influenzare la carica della proteina.

E' stata effettuata, quindi, una valutazione tra 3 diversi tamponi al fine di evidenziare quale di essi sia più idoneo nel predisporre la proteina serica a legare la piastra.

α -Gal/HSA e α -Gal/BSA sono state disciolte alla concentrazione di 5 μ g/ml nei tre diversi tamponi:

a) tampone fosfato (PBS) [136 mM NaCl, 2 mM KCl, 4 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄] pH 7.0-8.0;

b) tampone carbonato/bicarbonato (CBC) [35 mM NaHCO₃, 15 mM NaCO₃] pH 9.0-10.0

c) tampone Tris/NaCl (TBS) [50 mM Tris, 0.9% NaCl] pH 7.0-8.0.

Una migliore predisposizione della proteina serica, si traduce in una maggior presenza di residui α -Gal sul fondo della piastra. Un aumento del numero di tali residui è evidenziabile attraverso concentrazioni crescenti di anticorpo monoclonale primario anti α -Gal M86.

E' stato effettuato quindi un coating (secondo le procedure sopra descritte) di tre piastre ognuna con un tampone diverso. Ogni piastra è stata successivamente coperta con pellicola protettiva per evitare eventuali fenomeni di evaporazione, e incubata per 90 minuti a 37°C al buio.

Sono stati effettuati 3 lavaggi con 250 μ l per pozzetto di PBS sterile a temperatura ambiente. Il primo lavaggio è lasciato agire per 5 minuti, i due successivi per 3 minuti.

Il blocking è stato effettuato con 250 μ l per pozzetto di 1.5 % HSA in PBS sterile (pH 7.4), seguito dalla copertura della piastra con pellicola protettiva e incubazione per 2 ore a temperatura ambiente, al buio. Successivamente si eseguono 3 lavaggi con PBS sterile come sopra.

Ad ogni piastra, contenente un diverso tampone, sono stati aggiunti 100 μ l per pozzetto di quattro diverse concentrazioni di anticorpo primario M86 in PBS suddivise per colonne: [1:100], [1:50], [1:30], [1:20] v/v. Le piastre vengono quindi

ad essere incubate per tutta la notte a +4°C al buio. Vengono quindi effettuati tre lavaggi con PBS sterile come sopra.

Ad ogni pozzetto vengono aggiunti 100 µl della soluzione di anticorpo secondario (policlonale da coniglio anti-mouse) coniugato all'enzima perossidasi alla concentrazione di [1:500] v/v in PBS sterile. Segue la copertura della piastra con pellicola protettiva e la sua incubazione a 37°C al buio per 2 ore. Si eseguono 3 lavaggi con PBS sterile come sopra.

Aggiunta di 100 µl per pozzetto della soluzione di sviluppo per l'enzima perossidasi (o-fenilendiammina 200 µmoli in tampone fosfato-citrato e sodio perborato), copertura della piastra con pellicola protettiva e incubazione per 30 minuti al buio.

La lettura della piastra è stata effettuata in un lettore di piastre a 450 nm.

I risultati sono mostrati in figura 2. Dalla suddetta figura si evince come il tampone CBC garantisca una resa di legame della proteina serica e quindi una presenza di residui α-Gal sul fondo della piastra migliore del PBS per concentrazioni anticorpali comprese tra 1:100 e 1:50. A concentrazioni superiori le azioni dei tamponi CBC e PBS sono sovrapponibili.

Il tampone TBS, invece, ha dimostrato di predisporre la proteina serica ad un ottimale e più duraturo legame con il fondo dei pozzetti anche per elevate concentrazioni anticorpali come [1:30] e [1:20] v/v.

Sostanzialmente utilizzando per l'esecuzione del test la concentrazione di anticorpo M86 pari a [1:50] v/v, tutti i tamponi sono soddisfacenti. Tuttavia è preferibile utilizzare il tampone TBS per le spiccate proprietà coadiuvanti il legame tra la proteina serica e la plastica delle piastre utilizzate.

Referenze

1. Nkomo VT, Gardin JM, Skeleton TN, Gottdiener JS, Scott CG, Enriquez-Sarano M. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. Lancet 2006; 368: 1005-1011.
2. Zeng LY et al. A prompt method to quantitative assay of alpha-Gal on pig cell surface without injury. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2005; 36(3): 419-421.

3. Galili U et al. A sensitive assay for measuring alpha Gal epitope expression on cells by a monoclonal anti-Gal antibody. *Transplantation* 1998; 65: 1129-1132.
4. Chen RH, Kadner A, Mitchell RN, Santerre DH, Adams DH. alpha-Gal and beta-Gal are preferentially expressed on porcine cardiac microvascular endothelium. *Transplant Proc* 2000; 32: 877-878.
5. Feng W et al. Distribution of the Alpha-Gal epitope on adult porcine bone tissue. *Transplant. Proceed.* 2006; 38: 2247-2251.
6. Galili U. The alpha Gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy. *Immun. Cell Biol.* 2005; 83: 674-686.
7. Konakci KZ, Bohle B, Blumer R, Hoetzenecker W, Roth G, Moser B, Boltz-Nitulescu G, Gorlitzer M, Klepetko W, Wolner E, Ankersmit HJ. Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery. *Eur J Clin Invest.* 2005 Jan; 35(1): 17-23.
8. Park CS, Park SS, Choi SY, Yoon SH, Kim WH, Kim YJ. Anti alpha-gal immune response following porcine bioprosthesis implantation in children. *J Heart Valve Dis.* 2010 Jan; 19(1): 124-30.
9. Lila N, McGregor CG, Carpentier S, Rancic J, Byrne GW, Carpentier A. Gal knockout pig pericardium: new source of material for heart valve bioprostheses. *J Heart Lung Transplant.* 2010 May; 29(5): 538-43. Epub 2009 Dec 29.
10. Naso F, Gandaglia A, Iop L, Spina M, Gerosa G. First quantitative assay of alpha-Gal in soft tissues: presence and distribution of the epitope before and after cell removal from xenogeneic heart valves. *Acta Biomater.* 2011 Apr; 7(4): 1728-34. Epub 2010 Nov 29.
11. Stacchino C, Bona G, Bonetti F, Rinaldi S, Della Ciana L, Grignani A. Detoxification process for glutaraldehyde-treated bovine pericardium: biological, chemical and mechanical characterization. *J Heart Valve Dis.* 1998 Mar; 7(2):190-4.

Rivendicazioni

1. Metodo per la determinazione dello xenoantigene α -Gal in tessuti fissati con glutaraldeide comprendente almeno le fasi di:
 - sottoporre un campione del tessuto fissato ad un trattamento detossificante con acido omocisteico;
 - rilevare l'epitopo α -Gal mediante un saggio immunologico ELISA con un anticorpo monoclonale anti α -Gal;
 - determinare l'epitopo α -Gal mediante rilevazione per assorbanza a 450nm del segnale generato da detto anticorpo monoclonale libero e comparazione con una retta di taratura.
2. Metodo per la determinazione dello xenoantigene α -Gal in tessuti fissati con glutaraldeide secondo la rivendicazione 1, in cui è compresa l'ulteriore fase di:
 - produrre la retta di taratura mediante l'utilizzo di globuli rossi di coniglio per la determinazione quantitativa dell'epitopo α -Gal dopo rilevazione del segnale dell'anticorpo monoclonale anti α -Gal libero a 450nm.
3. Metodo per la determinazione dello xenoantigene α -Gal in tessuti fissati con glutaraldeide secondo la rivendicazione 1, in cui per il trattamento detossificante l'acido omocisteico è in tampone fosfato con un pH compreso tra 6.0 e 8.0 ad una concentrazione compresa tra 50 mM e 200mM.
4. Metodo per la determinazione dello xenoantigene α -Gal in tessuti fissati con glutaraldeide secondo la rivendicazione 3, in cui l'acido omocisteico è ad una concentrazione di 100 mM.
5. Metodo per la determinazione dello xenoantigene α -Gal in tessuti fissati con glutaraldeide secondo la rivendicazione 1, in cui per il saggio ELISA viene eseguito il coating della piastra con soluzioni di α -Gal/albumina serica ad una concentrazione compresa di 2.5 - 15 μ g/ml in una tampone scelto tra tampone fosfato pH 7.0-8.0, carbonato/bicarbonato pH 9.0-10.0 e Tris/NaCl pH 7.0-8.0.

6. Metodo per la determinazione dello xenoantigene α -Gal in tessuti fissati con glutaraldeide secondo la rivendicazione 5, in cui il coating della piastra è eseguito con soluzioni di α -Gal/albumina serica umana alla concentrazione di 5 μ g/ml in tampone Tris/NaCl.
7. Metodo per la determinazione dello xenoantigene α -Gal in tessuti fissati con glutaraldeide secondo la rivendicazione 1 comprendente le fasi di:
 - trattare un campione di tessuto per incubazione con una soluzione di acido omocisteico in tampone per 12 ore x 2 volte sotto agitazione, al buio ed a temperatura ambiente;
 - incubare il campione precedentemente trattato con l'anticorpo monoclonale primario anti α -Gal per 2 ore a 37°C;
 - centrifugare il campione a 14.340 g per 30 minuti a 4°C e separare il surnatante;
 - trattare per il coating una piastra a pozzetti con una soluzione tamponata di α -Gal/albumina serica;
 - lavare i pozzetti con un tampone e trattarli per il blocking con una soluzione tamponata di albumina serica al 1,5 % p/v per 2 ore a temperatura ambiente;
 - lavare i pozzetti con tampone, caricare il surnatante del campione centrifugato in precedenza e incubare per tutta la notte a 4°C;
 - lavare i pozzetti con tampone e caricare un anticorpo secondario policlonale coniugato all'enzima perossidasi ed incubare per tutta la notte a 4°C;
 - lavare con tampone, caricare i pozzetti con la soluzione di sviluppo e incubare al buio per 30 minuti;
 - eseguire la lettura della piastra con un lettore di piastre con rilevazione per assorbanza a 450 nm del segnale dell'anticorpo monoclonale libero.
8. Kit per l'esecuzione del metodo secondo una delle rivendicazioni da 1 a 7 comprendente almeno:
 - un primo contenitore contenente una soluzione di acido omocisteico;

- un secondo contenitore contenente l'anticorpo primario monoclonale anti α -Gal;
 - un ulteriore contenitore contenente l'anticorpo secondario policlonale da coniglio anti-topo coniugato all'enzima perossidasi;
 - libretto di istruzioni riportante la retta di taratura predisposta con concentrazioni note di globuli rossi di coniglio e la formula di conversione per il calcolo del numero di epitopi nel tessuto analizzato in base all'assorbanza del campione letta in piastra a 450 nm.
9. Kit secondo la rivendicazione 8, comprendente ulteriormente:
- un contenitore con il tampone di coating consistente in una soluzione di α -Gal/albumina serica in un tampone;
 - un contenitore con il tampone di blocking consistente in una soluzione di albumina serica in un tampone;
 - una soluzione per lo sviluppo dell'enzima perossidasi.
10. Uso del metodo secondo una delle rivendicazioni da 1 a 7 per il controllo di qualità di tutti quei tessuti biologici fissati utilizzabili per la fabbricazione di bioprotesi applicabili ad uso clinico umano.

Claims

1. A method for determining alpha-Gal xenoantigen in glutaraldehyde-fixed tissues comprising at least the steps of:
 - subjecting a sample of the fixed tissue to a detoxification treatment with homocysteic acid;
 - detecting the alpha-Gal epitope by an ELISA immunoassay with a monoclonal antibody anti alpha-Gal;
 - determining the alpha-Gal epitope by detection at 450 nm of the signal generated by the free amount of said monoclonal antibody and comparison with a calibration line.
2. The method for determining alpha-Gal xenoantigen in glutaraldehyde-fixed tissues according to claim 1, further comprising the step of:
 - creating the calibration line by using rabbit red blood cells for the quantitative determination of alpha-Gal epitope following the detection at 450nm of the signal of the free anti alpha-Gal monoclonal antibody.
3. The method for determining alpha-Gal xenoantigen in glutaraldehyde-fixed tissues according to claim 1, wherein for the detoxification treatment the homocysteic acid is in a phosphate buffer with a pH between 6.0 and 8.0 in a concentration comprised from 50 mM to 200 mM.
4. The method for determining alpha-Gal xenoantigen in glutaraldehyde-fixed tissues according to claim 3, wherein the homocysteic acid is in a concentration of 100 mM.
5. The method for determining alpha-Gal xenoantigen in glutaraldehyde-fixed tissues according to claim 1, wherein for the ELISA assay the plate coating operation is performed with solutions of alpha-Gal/serum albumin in a concentration comprised from 2.5 to 15 µg/ml in a buffer solution selected from phosphate pH 7.0-8.0, carbonate/bicarbonate pH 9.0-1.0, and Tris/NaCl pH 7.0-8.0 buffers.
6. The method for determining alpha-Gal xenoantigen in glutaraldehyde-fixed tissues according to claim 5, wherein the plate coating operation is carried out with solutions of alpha-Gal/human serum albumin in a concentration of 5 g µ/ml in Tris/NaCl buffer.

7. The method for determining alpha-Gal xenoantigen in glutaraldehyde-fixed tissues according to claim 1, comprising the steps of:
- treating a tissue sample by incubating the same twice with a solution of homocysteic acid in a buffer for 12 hr, under stirring, in the dark and at room temperature;
 - incubating the previously treated sample with the primary monoclonal antibody anti alpha-Gal for 2 hr at 37°C;
 - centrifuging the sample at 14,340 rpm for 30 min. at 4°C and separating the supernatant;
 - treating a well plate for the operation of coating with a solution of alpha-Gal/serum albumin in a buffer;
 - washing the wells with a buffer and treating them for the operation of blocking with a buffered solution of 1.5% w/v serum albumin for 2 hr at room temperature;
 - washing the wells with the buffer, loading the supernatant of the previously centrifuged sample and incubating overnight at 4°C;
 - washing the wells with the buffer, loading a secondary polyclonal antibody and incubating overnight at 4°C;
 - washing with buffer, loading the wells with the development solution and incubating in the dark for 30 minutes;
 - reading the plate with a plate reader at 450 nm for the detection of the free monoclonal antibody signal.
8. A kit for carrying out the method according to one of claims 1 to 7 comprising at least:
- a first container containing a solution of homocysteic acid;
 - a second container containing the primary monoclonal antibody alpha-Gal;
 - a further container containing the secondary polyclonal antibody conjugated with the peroxidase enzyme;
 - a leaflet showing the calibration line arranged with known concentrations of rabbit red blood cells and the conversion formula for calculating the number of epitopes in the analyzed tissue according to

the sample absorbance read in a plate at 450 nm.

9. The kit according to claim 8, further comprising:
 - a container with the coating buffer consisting of a solution of alpha-Gal/serum albumin in a buffer;
 - a container with the blocking buffer consisting of a solution of serum albumin in a buffer;
 - a container with a solution for the development of peroxidase enzyme.
10. Use of the method according to one of claims 1 to 7 for the quality control of the biological fixed tissue usable for manufacturing prostheses of human clinical use.

Figura 1

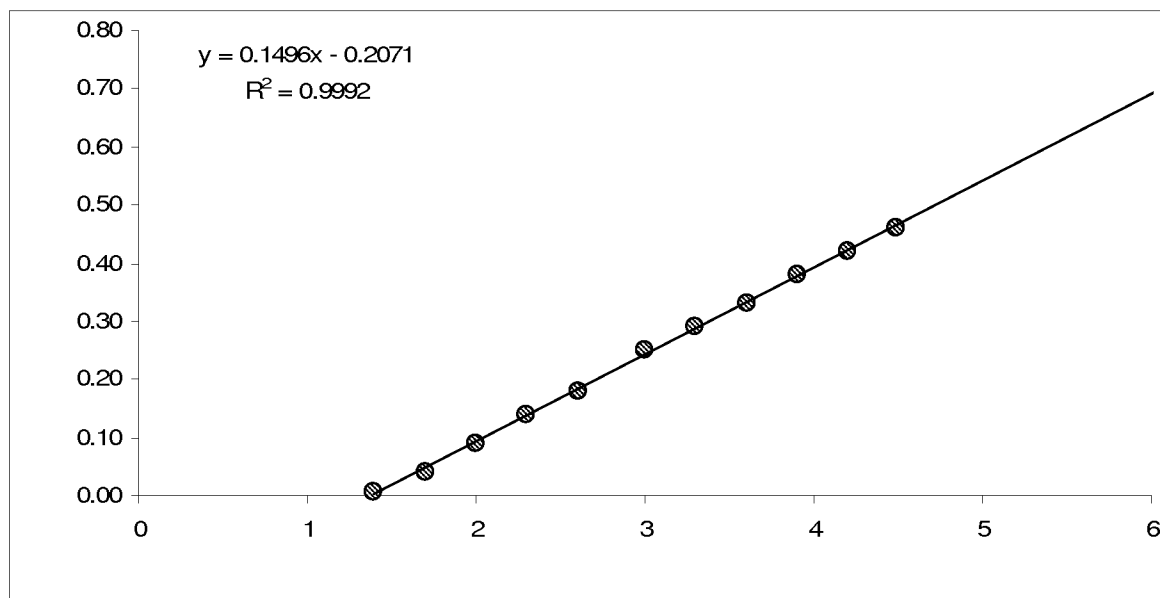


Figura 2

