



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

UIBM

DOMANDA NUMERO	101982900001256
Data Deposito	21/12/1982
Data Pubblicazione	21/06/1984

Priorità	82 01547
Nazione Priorità	GB
Data Deposito Priorità	20-JAN-82

Titolo

METODO E REAGENTI PER L'USO DI β -GALATTOSIDASI COME MARCANTE IN
IMMUNOCITOCHIMICA

DOCUMENTAZIONE RILEGATA

808186
Descrizione dell'invenzione avente per titolo

-1-

"METODO E REAGENTI PER L'USO DI β -GALATTOSIDASI
COME MARCANTE IN IMMUNOCITOCHIMICA"

della Farmitalia Carlo Erba S.p.A., Via Imbonati 24,
Milano (Inventori: Giorgio Chierregatti, Enzo
Murador)

24880A/32

21 DIC. 1982

RIASSUNTO

La presente invenzione fornisce un metodo diagnosti-
co di tipo immunocitochimico per l'identificazione
di particolari antigeni su preparati istologici.

Secondo il metodo dell'invenzione il riconoscimento
degli antigeni da rivelare viene effettuato, su fet-
tine di tessuto sia congelate che incluse, mediante
l'uso di anticorpi marcati con l'enzima β -D-galatto-
sidasi ed il successivo trattamento con un substrato
precipitante di suddetto enzima.

Il metodo dell'invenzione permette la rivelazione
cromatica e il riconoscimento di particolari cellule
nel tessuto in esame mediante l'uso di reattivi sta-
bili e di un comune microscopio ottico.

TESTO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione ha per oggetto un metodo
citochimico immunoenzimatico per l'identificazione
di antigeni in tessuti nel quale la β -D-galattosidasi

è usata come marcante.

-2-

L'invenzione comprende anche i reagenti per l'esecuzione di detto metodo.

Anticorpi marcati con enzimi e sostanze fluorescenti vengono comunemente usati in immunoistochimica per evidenziare la localizzazione degli antigeni nei tessuti (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 47:200-202, 1941; J. Immunol. 45:159-170, 1942; J. Exp. Med. 91:1-13, 1950; Arch. Pathol. Lab. Med. 102:113-121, 1978; J. Clin. Pathol. 27:14-20, 1974).

Tuttavia, l'immunolocalizzazione per mezzo di enzimi ha acquisito recentemente maggiore diffusione poichè offre ai patologi alcuni vantaggi ben definiti rispetto all'immunofluorescenza. Questi vantaggi comprendono la maggiore stabilità, il miglior contrasto e dettaglio dei preparati colorati, la stabilità dei vetrini, la salvaguardia del tessuto circostante e, per la maggior parte degli antigeni, l'impiego di materiale preparato con procedimenti standardizzati di fissaggio ed inclusione per microscopia ottica.

A motivo di detti vantaggi, i metodi immunoenzimatici risultano essere metodi altamente sensibili e precisi, così che, fra le tecniche immunoistochimiche, quelle istochimiche immunoenzimatiche sono oggi le più usate in patologia diagnostica. I metodi citochimici immuno-

enzimatici, in particolare istochimici, hanno fornito im- -3-
portanti informazioni in patologia renale, per esempio,
nello studio di malattie batteriche e virali, nella
fisiopatologia del sistema immunitario come pure
della secrezione ormonale.

Inoltre sono stati evidenziati rivelatori specifici
di determinate malattie e tipi di cellule ottenendo
significative informazioni riguardo alla istoge-
nesi e differenziazione di tumori.

Una grande quantità di prodotti cellulari, fra cui
enzimi, ormoni steroidei e polipeptidici, immunoglo-
buline, antigeni dello sviluppo oncogeno, antigeni
virali ed altre proteine cellulari, sono stati messi
in evidenza in sezioni di tessuto congelate o sotto-
poste convenzionalmente a tecniche di fissaggio ed
inclusione, utilizzando le metodiche summenzionate.

Più estese applicazioni di questi metodi comprendono,
per esempio, l'evidenziazione di varie classi di
immunoglobuline nei tumori di origine linforeticolare
e nei processi linfoproliferativi atipici, l'identi-
ficazione di ormoni polipeptidici nei tumori endocrini
e l'evidenziazione di vari rivelatori tumorali come
l'antigene carcinoembrionico e l' α -fetoproteina in
condizioni neoplastiche e preneoplastiche.

Un conciso sommario di alcune applicazioni delle tec-

niche immunoenzimatiche in istopatologia è riportato
in Human Pathology, 12, 590-596 (1981).

-4-

Vi sono elencati non meno di 70 possibili campi di applicazione.

La possibilità di identificare in cellule e tessuti, routinariamente fissati ed inclusi in paraffina, una grande varietà di segnalatori, alcuni dei quali specifici per una determinata malattia ed altri addirittura eziologici, offre al patologo nuovi criteri obiettivi di diagnosi al posto dei tradizionali parametri, spesso soggettivi, puramente morfologici.

La perossidasi rappresenta normalmente l'enzima a più larga diffusione in immunocitochimica [Am. J.

Clin. Pathol. 71: 483-488, 1979]. Benchè, da una parte, quest'enzima offra vantaggi come notevole stabilità, possibilità di utilizzare un substrato insolubile ad alta definizione e di formare catene costituite da strati multipli di anticorpi con tipi di legami esclusivamente immunologici (ad es. il sistema perossidasi-antiperossidasi, PAP), diversi svantaggi sono emersi durante l'uso di tali metodi raggruppati sotto il termine comune di "immunoperossidasi".

Perossidasi e pseudoperossidasi endogene sono presenti in alcuni tessuti e possono condurre a falsi ri-

sultati positivi; il substrato cromogeno più largamente usato: 3,3',4,4'-diaminobenzidina tetracloridrato (DAB) possiede un'elevata azione carcinogena

[Registry of toxic effects of Chemical Substances - Ed. NIOSH - U.S. Dept. of Health and Human Services - Cincinnati - 1980] e diventa sempre più difficile trovare in commercio un composto ad alto grado di purezza [J. Histochem. N. 28, pagg. 191-192 (1980)].

La soluzione usata per evidenziare la perossidasi è instabile e deve essere preparata soltanto pochi minuti prima dell'uso [Stenberger L.A.: Immunocytochemistry - 2nd Edition - John Wiley and Sons - New York - 1979].

Inoltre, il substrato cromogeno della perossidasi mostra una colorazione intensamente marrone

contro uno sfondo marrone chiaro, cosa che pone talvolta seri problemi nella determinazione del preparato e può portare a risultati positivi erronei. Sono stati proposti substrati alternativi per perossidasi od altri enzimi come, per esempio, glucosio ossidasi e fosfatasi alcalina, ma sinora non sono stati ottenuti risultati paragonabili a quelli forniti dal sistema perossidasi + DAB, specialmente perchè molti metodi portano alla formazione di composti cromogeni solubili nei solventi organici utiliz-

zati per disidratare e purificare i preparati, oppure meno sensibili nel rivelare gli antigeni tissutali. Noi abbiamo trovato che l'impiego di β -D-galattosidasi come marcante permette di ovviare agli svantaggi comuni alle tecniche citochimiche immunoenzimatiche note, in particolare al metodo citochimico immunoperossidasi.

Conseguentemente, la presente invenzione ha per oggetto un metodo citochimico immunoenzimatico per l'identificazione di antigeni nei tessuti, particolarmente tessuti umani, caratterizzato dal fatto che l'enzima β -D-galattosidasi viene impiegato come marcante.

Secondo l'invenzione l'identificazione degli antigeni nei tessuti si ottiene tramite la formazione di un prodotto insolubile e colorato generato per azione della β -D-galattosidasi su uno specifico substrato cromogeno.

Più precisamente l'invenzione ha per oggetto un metodo per l'identificazione di antigeni in tessuti comprendente il legare l'enzima β -D-galattosidasi all'antigene da identificare tramite qualsiasi possibile legante specifico ed il rivelare l'attività della β -D-galattosidasi per mezzo della reazione con uno specifico substrato in grado di fornire un prodotto

insolubile e colorato per azione della β -D-galattosidasi. -7-

L'enzima β -D-galattosidasi usato nel metodo dell'invenzione può essere qualsiasi β -D-galattosidasi di origine microbica, benchè esso sia, preferibilmente, β -D-galattosidasi da *Escherichia coli*.

Secondo l'invenzione la β -D-galattosidasi può essere legata all'antigene da identificare tramite qualsiasi tipo di legante specifico. In particolare, per esempio, qualsiasi tecnica di marcatura o di coniugazione già descritta per perossidasi nei metodi immunoperoxidasici, può essere utilizzata per legare la β -D-galattosidasi all'antigene da rivelare.

Secondo la tecnica preferita, detto antigene viene fatto reagire con un primo anticorpo specifico per l'antigene stesso e che, a sua volta, viene legato alla β -D-galattosidasi o direttamente o tramite qualsiasi sistema di coniugazione in grado di dare un coniugato con β -D-galattosidasi.

Un opportuno coniugato con β -D-galattosidasi può essere, in particolare, per esempio, un anti-anticorpo enzima-coniugato del tipo descritto, per esempio, in FEBS Lett. 95, 311 (1978) o in Am. J. Clin. Pathol. 71, 483 (1979), oppure un sistema biotina-avidina enzima coniugato, in qualunque delle sue possibili configurazioni, per esempio del tipo riportato in

J. Histochem. Cytochem. vol. 27, n. 8, 1131 (1979).

-8-

Preferibilmente lo stadio della reazione dell'antigene da identificare con il primo anticorpo specifico per l'antigene stesso ed il successivo stadio o stadi che portano a stabilire un ponte fra detto specifico anticorpo e la β -D-galattosidasi, vengono eseguiti consecutivamente.

Per evidenziare l'attività della β -D-galattosidasi, secondo il metodo dell'invenzione può essere usato qualsiasi substrato cromogeno che sia specifico per l'enzima β -D-galattosidasi e che, in aggiunta, sia in grado di fornire, per azione della β -D-galattosidasi, un prodotto di reazione colorato, insolubile e stabile. Il prodotto che si origina da detto substrato cromogeno per azione della β -D-galattosidasi, oltre ad essere colorato e stabile, deve essere insolubile o nei solventi acquosi o nei solventi organici comunemente usati per trattare i tessuti in istologia, essendo preferibilmente insolubile in ambedue i tipi di solventi suddetti sia acquosi che organici.

Preferibilmente, il substrato cromogeno specifico per la β -D-galattosidasi è solubile negli stessi solventi.

Questo substrato cromogeno con specificità per la β -D-galattosidasi può essere qualsiasi derivato β -D-galattosidico che, una volta scisso dall'enzima, sia in

grado di produrre una sostanza colorata, insolubile e stabile come sopra specificato.

Esempi di substrati cromogeni particolarmente utili secondo il metodo dell'invenzione sono, per esempio, alcuni derivati indolil- e naftil- β -D-galattosidici. Substrati particolarmente preferiti sono i derivati indolil- β -D-galattosidici e, fra questi, è più particolarmente preferito il 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galattoside.

Fra i derivati naftil- β -D-galattosidici il 6-bromo-2-naftil- β -D-galattoside è uno dei preferiti.

Per evidenziare l'attività della β -D-galattosidasi può essere talvolta necessario far reagire il substrato cromogeno in presenza di uno o più reagenti addizionali che possono essere, per esempio, copulanti, ossidanti od agenti di trasferimento di elettroni.

Così, per esempio, quando si usa come substrato cromogeno un derivato naftil- β -D-galattosidico, per rivelare l'attività enzimatica si richiede la presenza di un opportuno azo-copulante il quale azo-copulante può anche essere opzionalmente presente nel reattivo di rivelazione dell'attività allorchè si impiega un cromogeno indolil- β -D-galattosidico.

Azo-copulanti opportuni possono essere, per esempio, p-rosanilina esaazotata, Fast Blue VB, BB e RR, Fast

Garnet GBC e simili, essendo particolarmente preferita la p-rosanilina esaazotata.

Inoltre, per accelerare la reazione catalizzata dall'enzima, in particolare quando si usa un substrato indolil- β -D-galattosidico, nel mezzo di reazione può anche essere opzionalmente presente un ossidante od un agente di trasferimento di elettroni.

Agenti ossidanti o di trasferimento di elettroni possono essere, purchè appropriati, tutti quelli noti come agenti ossidanti o di trasferimento di elettroni in chimica organica ed inorganica, con preferenza generalmente per gli agenti inorganici.

Esempi di agenti ossidanti o di trasferimento di elettroni preferiti sono, in particolare, fenazina metosolfato, sali di tetrazolio oppure qualsiasi coppia ionica red-ox appropriata.

Un sale di tetrazolio opportuno può essere, per esempio, il cloruro di p-nitro-blu-tetrazolio oppure il cloruro di tetranitro-blu-tetrazolio.

Una coppia ionica red-ox opportuna può essere, per esempio, scelta nel gruppo delle coppie ioniche

$\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, $\text{Ce}^{2+}/\text{Ce}^{4+}$, $\text{I}^{-}/\text{VO}_4^{3-}$, $\text{I}^{-}/\text{VO}_3^{-}$, $\text{I}^{-}/\text{WO}_4^{2-}$, $\text{I}^{-}/\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$, $\text{I}^{-}/\text{Mo}_4^{2-}$, $\text{I}^{-}/\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ e simili.

Coppie del tipo $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, in particolare, possono essere fornite, e.g., dai rispettivi cianuri complessi

o sali solfato; cianuri complessi sono preferibilmente ferrocianuri/ferricianuri alcalini, in particolare potassio ferrocianuro/ferricianuro. Coppie Ce^{2+}/Ce^{4+} sono preferibilmente fornite dai rispettivi sali solfato. Le coppie anioniche sono fornite dai rispettivi sali, preferibilmente sali con metalli alcalini o alcalino-terrosi. Secondo il metodo dell'invenzione i campioni di tessuto possono essere preparati mediante qualsiasi procedura nota, e.g. procedimenti di fissaggio, inclusione e congelamento comunemente usati in istochimica.

Per esempio, tessuti fissati con formalina ed inclusi in paraffina possono essere esaminati molto facilmente col metodo dell'invenzione.

L'esame dei campioni può essere eseguito con ogni normale microscopio ottico con ingrandimenti di 20-800 volte.

L'impiego dell'enzima β -D-galattosidasi e di opportuni substrati cromogeni specifici permette di ovviare, come già detto, agli svantaggi che si incontrano impiegando, e.g., perossidasi.

In particolare, per esempio, i problemi causati dalla presenza nei campioni di tessuto di perossidasi e pseudoperossidasi endogene, che, come anche detto precedentemente, costituiscono una grande limitazione dei metodi immunoistochimici perossidasici, vengo-

no ovviati nel metodo dell'invenzione sia perchè l'enzima β -D-galattosidasi è normalmente assente dai tessuti umani, sia perchè, in ogni caso, il campo di pH per l'attività della β -D-galattosidasi umana è completamente differente dal campo di pH per l'attività della β -D-galattosidasi microbica usata nel metodo dell'invenzione: il "range" di pH per l'attività della β -D-galattosidasi umana è circa 5,5-6 mentre e.g., il "range" di pH di attività della β -D-galattosidasi dell'*Escherichia coli* è circa 7,0-7,5.

Inoltre la β -D-galattosidasi viene inattivata in meno di un minuto a circa 55°C [The Enzymes 1960 2nd Ed. pagg. 409-430 Vol. 4 Ed.: P.D. BOYER, H. LARDY, K. MYRBACK, Academic Press - New York] la quale è una temperatura che si raggiunge normalmente durante i convenzionali procedimenti di inclusione.

Grazie all'assenza di interferenza da parte di β -D-galattosidasi endogene, i problemi della colorazione di fondo che insorgono con le perossidasi comunemente impiegate a motivo dell'attività perossidasi-simile nei tessuti, non si incontrano con la β -D-galattosidasi.

La β -D-galattosidasi microbica non produce colorazione di fondo nei tessuti dei mammiferi e reagisce con i substrati cromogeni disponibili creando profili

morfologici altamente contrastati e caratteristici.

-13-

Le colorazioni ottenute sono assai meglio definite e distinte di quelle usualmente ottenibili con le tecniche perossidasiche anche in vista del fatto che la maggior parte dei substrati cromogeni utilizzati per la β -D-galattosidasi permette di ottenere un fondo quasi totalmente incolore. Ne consegue che la visualizzazione ed il riconoscimento dei siti di immunoreattività specifica sono grandemente facilitati.

Ciò implica una aumentata sensibilità per il metodo con β -D-galattosidasi oggetto dell'invenzione e lo rende specialmente utile per l'esame di tessuti con lesioni emorragiche od infiammatorie.

In aggiunta, i reattivi usati per le reazioni istologiche della β -D-galattosidasi, in particolare, per esempio, i cromogeni indolil β -D-galattosidici preferibilmente usati, non sono conosciuti come carcinogeni a differenza della diaminobenzidina, substrato ad elevato contrasto largamente usato per la colorazione della perossidasi.

Inoltre, i reagenti usati per eseguire il metodo dell'invenzione sono stabili e producono sezioni che sono esse pure permanentemente stabili e che richiedono l'uso di un semplice microscopio ottico normale.

Grazie ai vantaggi brevemente riportati sopra, il me-

todo β -D-galattosidasi-immunocitochimico dell'invenzione è dotato di un elevatissimo grado di precisione e sensibilità, che sta alla pari almeno con quello delle tecniche perossidasiche, mentre, nello stesso tempo, è privo degli svantaggi che caratterizzano queste ultime tecniche.

A motivo dell'elevata sensibilità, il metodo dell'invenzione permette di raggiungere risultati ottimali anche nella localizzazione di antigeni su materiali fissati ed inclusi routinariamente nei quali l'antigenicità residua è soltanto una frazione di quella del tessuto congelato.

Benchè con il metodo dell'invenzione non sia di norma necessario un pretrattamento dei campioni di tessuto, tuttavia, allo scopo di aumentare ulteriormente la sensibilità della tecnica, un pretrattamento, e.g. secondo Heydermann [J. Clin. Pathol. 32, 971-978 (1979)], può essere talvolta utile per eliminare possibili leggere interferenze delle perossidasi endogene e/o del ferro tissutale.

Il metodo dell'invenzione permette di identificare una grande varietà di prodotti cellulari e, in particolare, un grande numero di rivelatori, molti dei quali specifici per determinate malattie ed alcuni addirittura eziologici, i quali prodotti cellulari

e rivelatori possono essere, per esempio, quelli
previamente indicati in questa domanda di brevetto.

L'invenzione fornisce anche reagenti per la realizzazione del metodo β -D-galattosidasi-immunoistochimico descritto sopra.

Un reagente può essere sia

- 1) un reagente specifico comprendente, come componenti essenziali, a) un anticorpo specifico per l'antigene da identificare, b) β -D-galattosidasi o un β -D-galattosidasi coniugato e c) un substrato cromogeno specifico per β -D-galattosidasi e in grado di produrre un composto insolubile e colorato per azione della β -D-galattosidasi; sia
- 2) un reagente comprendente, come componenti essenziali, a') un anti-anticorpo coniugato con β -D-galattosidasi e b') un substrato cromogeno specifico per la β -D-galattosidasi e in grado di produrre un composto insolubile e colorato per azione della β -D-galattosidasi.

Ovviamente un reagente del tipo indicato al punto 1) è utile soltanto per la identificazione di quel particolare antigene che è riconoscibile dall'anticorpo del componente a), specifico per l'antigene stesso.

Al contrario, un reagente del tipo indicato al punto

2) è adatto per la identificazione di qualsiasi anti-

gene. Infatti l'anti-anticorpo coniugato con β -D-galattosidasi nel componente a') è tale da riconoscere indistintamente qualsiasi anticorpo specifico per l'antigene da identificare purchè quest'ultimo anticorpo sia originato in una specie rispetto alla quale l'anti-anticorpo del componente a') è "anti". Conseguentemente l'anti-anticorpo del componente a') è "specie-specifico" cioè è specifico per la specie in cui l'anticorpo diretto all'antigene da identificare è originato.

Così, per esempio, un anti-anticorpo che è "anti-coniglio" (cioè 'anti' alla specie coniglio) è in grado di riconoscere qualsiasi anticorpo originato in coniglio; un anti-anticorpo che è "anti-capra" o "anti-pecora" è in grado di riconoscere qualsiasi anticorpo originato in capra o, rispettivamente, in pecora e, analogamente, un anti-anticorpo che è "anti-topo" è in grado di riconoscere qualsiasi anticorpo originato in topo.

La presente invenzione fornisce perciò vari reagenti del tipo 2) sopra indicato i quali differiscono l'uno dall'altro per quanto concerne la "specie-specificità". Tali reagenti sono, ad esempio, un reagente coniglio specifico contenente un antisiero anticoniglio coniugato con β -D-galattosidasi come

componente a'); un reagente capra-specifico (o pecora specifico) contenente un antisiero anti-capra (o anti-pecora) coniugato con β -D-galattosidasi come componente a'); e un reagente topo-specifico contenente un antisiero anti-topo coniugato con β -D-galattosidasi come componente a').

Ciascun tipo di reagente 2) può essere usato per la identificazione di qualsiasi antigene, purchè come anticorpo specifico per l'antigene venga impiegato un anticorpo originato nella specie appropriata: questa specie sarà, ad esempio, il coniglio per un reagente coniglio-specifico, la capra o la pecora per un reagente capra- o pecora-specifico e il topo per un reagente topo-specifico.

E' evidente ad ogni modo che, in qualsiasi caso, un anticorpo specifico per l'antigene da identificare, anche se non incluso nel reagente di tipo 2), deve essere sempre impiegato per poter rivelare l'antigene.

Se desiderato, un anticorpo specifico per l'antigene da identificare o una serie di anticorpi specifici per una serie di antigeni da identificare possono essere separatamente forniti insieme con il reagente 2).

Ciascuno dei reagenti di tipo 1) e 2) sopra descritti

ti può addizionalmente contenere un certo numero di ulteriori componenti quali, per esempio, azo-copulanti, ossidanti o agenti di trasferimento di elettroni, e tamponi.

I vari componenti di ciascun reagente possono essere confezionati, sia insieme che separatamente, in una qualsiasi conveniente maniera che consenta il facile e rapido uso del reagente stesso.

In ciascun reagente le caratteristiche dei vari componenti sono quelle precedentemente riportate nel descrivere il metodo dell'invenzione e i componenti preferiti sono pure gli stessi indicati come preferenziali nella precedente descrizione.

Così, per esempio, in una forma di realizzazione preferita, il reagente di tipo 1) comprende come componenti essenziali a) un anticorpo specifico per l'antigene da identificare, b) uno specifico β -D-galattosidasi-coniugato, e c) un indolil- β -D-galattoside come substrato cromogeno.

In una forma di realizzazione preferita il reagente di tipo 2) comprende, come componenti essenziali, a') un anti-anticorpo specie-specifico coniugato con β -D-galattosidasi, e b') un indolil- β -D-galattoside come substrato cromogeno.

Nella suddetta forma di realizzazione preferita del

reagente 1) lo specifico β -D-galattosidasi coniugato è, preferibilmente, un anti-anticorpo coniugato con β -D-galattosidasi o un sistema Biotina-Avidina coniugato con β -D-galattosidasi.

Nella suddetta forma di realizzazione preferita del reagente 2) l'anti-anticorpo specie-specifico coniugato con β -D-galattosidasi è, preferibilmente, un anticorpo anti-coniglio coniugato con β -D-galattosidasi, o un anticorpo anti-capra o anti-pecora coniugato con β -D-galattosidasi o un anticorpo anti-topo coniugato con β -D-galattosidasi.

In entrambe le suddette forme di realizzazione preferite dei reagenti 1) e 2) il substrato cromogeno indolil- β -D-galattoside è, preferibilmente, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galattoside.

I seguenti esempi servono ad illustrare l'invenzione ma non la limitano in alcun modo.

Esempio 1

L'insulina umana nel pancreas umano fu identificata con la seguente procedura. Si utilizzò tessuto pancreatico umano fissato in formalina al 10% tamponata con tampone fosfato e incluso routinariamente in paraffina. Gli strati sezionati di paraffina vennero immersi in fisiologica tamponata con tampone fosfato (PBS) a pH 7,2 e trattati per 5 minuti con H_2O_2 7,5%, indi per 5 minuti con

acido periodico 2,28% ed infine per 2 minuti con NaBH_4 0,002% [J. Clin. Pathol. 32, 971-978 (1979)].

Dopo alcuni lavaggi in PBS, le sezioni furono incubate a 4°C per una notte con un antisiero di coniglio anti-h-insulina diluito 1/1000 con PBS.

Dopo lavaggio in PBS, anticorpi immunoglobulinici anti-coniglio prodotti in asini e coniugati a β -D-galattosidasi da Escherichia coli secondo il procedimento riportato in FEBS Letters 95, 311 (1978), diluiti 1/30 in PBS contenente l'1% di siero suino normale, furono aggiunti alle sezioni. Dopo 30 minuti a temperatura ambiente, i tessuti furono lavati in PBS e l'attività enzimatica rivelata con una soluzione ottenuta sciogliendo in PBS a pH 7,2:

5-Br-4-Cl-3-indolil- β -D-galattoside	0,44 g/l
Magnesio cloruro	1,1 mM/l
Potassio ferricianuro	3,0 mM/l e
Potassio ferrocianuro	3,0 mM/l .

Il trattamento con questa soluzione di rivelazione fu eseguito incubando per 1 ora a 37°C. Dopo lavaggio i nuclei vennero contrassegnati colorandoli con rosso neutro e le sezioni vennero disidratate e montate in Eukitt^R.

I tessuti furono esaminati con un microscopio ottico (Leitz Orthoplan) a 200 ingrandimenti. I luoghi

di reazione positiva apparivano intensamente colorati in blu. La colorazione positiva era molto evidente in quanto il fondo era incolore ed i nuclei apparivano colorati in rosso. I risultati furono confrontati con quelli ottenuti negli stessi tessuti trattati con lo stesso antisiero anti-insulina e poi esaminati secondo la procedura perossidasi PAP [Sternberger - J. Histochem. Cytochem. 18, 315 (1970)]. Il risultato con la procedura perossidasi fu una reazione positiva di intenso colore marrone. La colorazione positiva era però meno evidente e meno nitida di quella ottenuta con il metodo β -D-galattosidasico a causa della leggera colorazione marrone del fondo. Così con il metodo/ β -D-galattosidasi permette di ottenere risultati di colorazione molto migliori di quelli ottenuti con il procedimento perossidasi PAP.

Esempio 2

Impiegando il procedimento dell'esempio 1 ma sostituendo gli appropriati antisieri, tutti prodotti nel coniglio, all'antisiero anti-insulina, vennero identificati anche i seguenti antigeni:

caseina umana in tessuto mammario umano;

antigeni di superficie di epatite B (HBsAg) in fegato umano;

lisozima umano in intestino tenue umano;

mioglobina umana in muscolo scheletrico umano;

-22-

e

glucagone umano in pancreas umano.

Furono raggiunti risultati analoghi a quelli ottenuti nell'esempio 1.

Esempio 3

La mioglobina umana nel muscolo scheletrico fu identificata con la seguente procedura. Si impiegò tessuto di muscolo scheletrico umano fissato in formalina al 10% in tampone fosfato ed incluso secondo routine in paraffina. Le sezioni paraffiniche vennero portate in PBS ed incubate per una notte a 4°C con un antisiero anti-mioglobina di coniglio (Behringwerke) diluito 1/500 con PBS. Dopo lavaggio in PBS fu seguita la procedura dell'esempio 1 e furono ottenuti gli stessi risultati.

Procedendo analogamente ed impiegando gli antisieri opportuni furono identificati i seguenti antigeni:

insulina umana in pancreas umano;

caseina umana in tessuto mammario umano;

antigene di superficie di epatite B (HBsAg) in fegato umano;

lisozima umano in intestino tenue umano;

glucagone umano in pancreas umano.

Esempio 4

L'antigene di superficie di epatite B (HBsAg) nel fegato umano fu identificato come segue. Fu impiegato tessuto di fegato umano fissato ed incluso come descritto nell'esempio 1. Si seguì la procedura dell'esempio 1 sostituendo all'antisiero anti-insulina un antisiero di coniglio anti HBsAg (Behringwerke) diluito 1/500 con PBS.

Si usò inoltre una soluzione PBS di rivelazione come quella impiegata nell'esempio 1 ma priva di potassio ferrocianuro e di potassio ferricianuro. Con questa procedura si ottenne lo stesso tipo di risultato ottenuto nell'esempio 1.

Procedendo analogamente ma impiegando gli antisieri opportuni vennero identificati i seguenti antigeni:

insulina umana in pancreas umano;

caseina umana in tessuto mammario umano;

lisozima umano in intestino tenue umano;

mioglobina umana in muscolo scheletrico umano;

glucagone umano in pancreas umano.

Esempio 5

Il lisozima umano nell'intestino tenue umano fu identificato con la seguente procedura. Si impiegò tessuto di intestino tenue umano fissato ed inglobato come descritto nell'esempio 1. Si seguì la procedura dell'esempio 1 sostituendo all'antisiero anti-

-insulina un antisiero di coniglio anti-lisozima

-24-

(DAKO) diluito 1/500 con PBS ed usando come soluzione di rivelazione una soluzione di PBS a pH 7,2 contenente:

5-Br-4-Cl-3-indolil- β -D-galattoside	0,44 g/l
Magnesio cloruro	1,1 mM/l
Potassio ioduro	1%
Sodio tungstato	0,0015%

Furono raggiunti risultati analoghi a quelli ottenuti nell'esempio 1.

Procedendo analogamente ed impiegando gli antisieri opportuni furono identificati i seguenti antigeni:

insulina umana in pancreas umano;

caseina umana in tessuto mammario umano;

antigene di superficie di epatite B (HBsAg) in fegato umano;

mioglobina umana in muscolo scheletrico umano;

glucagone umano in pancreas umano..

Esempio 6

La caseina umana fu identificata in tessuto mammario umano con la seguente procedura. Fu usato tessuto mammario umano congelato. Vennero preparate delle sezioni di tessuto in criostato e ^{vennero} trattate come nell'esempio 1 utilizzando come sostituto dell'antisiero anti-insulina un antisiero di coniglio anti-caseina

diluito 1/1000 in PBS.

Vennero conseguiti risultati analoghi a quelli ottenuti nell'esempio 1.

Procedendo analogamente con tessuti congelati ed impiegando gli opportuni antisieri vennero identificati i seguenti antigeni:

insulina umana in pancreas umano;

antigene di superficie di epatite B (HBsAg) in fegato umano;

lisozima umano in intestino tenue umano;

mioglobina umana in muscolo scheletrico umano;

glucagone umano in pancreas umano.

Esempio 7

L'antigene di superficie di epatite B (HBsAg) in tessuto di fegato umano fu identificato come segue. Fu impiegato tessuto di fegato umano fissato ed incluso come descritto nell'esempio 1. Gli strati sezionati di paraffina vennero immersi in fisiologica tamponata con tampone fosfato (PBS) a pH 7,2.

Dopo lavaggio in PBS per 15 minuti le sezioni furono incubate a 37°C per 2 ore con antisiero di coniglio anti-HBsAg (soluzione 1:500 in PBS) e quindi lavate di nuovo con PBS. Le sezioni furono poi trattate con 50 ml di una soluzione in PBS contenente frammenti Fc di immunoglobuline di coniglio originate in

asini ($4,5 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$) e coniugate con β -D-galattosidasi da Escherichia Coli ($1,5 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$) secondo la procedura riportata in FEBS Letters 95,311 (1978), e contenente l'1% di siero normale di asino.

Dopo 30 minuti a temperatura ambiente le sezioni furono lavate con PBS per 15 minuti, quindi una soluzione di rivelazione ottenuta sciogliendo in PBS a pH 7,2

5-Br-4-Cl-3-indolil- β -D-galattosidase	0,44 g/l
Magnesio cloruro	0,9 mM/l
Sodio ioduro	1%
Sodio tungstato	0,0015%,

fu applicata su di esse.

Dopo incubazione per 30 minuti a temperatura ambiente e lavaggio con PBS i nuclei furono contrassegnati colorandoli con rosso neutro e le sezioni vennero disidratate e montate in Eukitt^R.

I tessuti furono esaminati con un microscopio ottico [Leitz Orthoplan] a 200 ingrandimenti. I luoghi di reazione positiva apparivano intensamente colorati in blu. La colorazione positiva era molto evidente in quanto il fondo era incolore ed i nuclei apparivano colorati in rosso. I risultati furono confrontati con quelli ottenuti negli stessi tessuti trattati con lo stesso antisiero anti-HBsAg e poi esami-

nati secondo la procedura perossidasi PAP secondo Sternberger (vedi citazione in esempio 1). Risultati analoghi a quelli descritti nell'esempio 1 furono osservati.

La stessa procedura dell'esempio 7 fu ripetuta usando una soluzione di rivelazione contenente sodio tetraborato (0,0015%) o, rispettivamente, sodio molibdato (0,0075%) invece del sodio tungstato.

Risultati analoghi a quelli descritti nell'esempio 1 furono osservati anche in questi casi.

Esempio 8

Per la identificazione istochimica dell'antigene di superficie di epatite B (HBsAg) su 50 sezioni di tessuto epatico umano fu preparato un reagente contenente :

- a) una soluzione 1:500 in PBS di antisiero di coniglio anti-HBsAg : 2,5 ml;
- b) una soluzione 1:100 in PBS di frammenti Fc di immunoglobuline di coniglio coniugate con β -D-galattosidasi da Escherichia Coli : 2,5 ml; e
- c) un componente liofilizzato da disciogliersi prima dell'uso in acqua distillata a dare 2,5 ml di una soluzione acquosa della composizione seguente:

5-Br-4-Cl-3-indolil- β -D-galattoside 0,44 g/l

Magnesio cloruro 0,9 mM/l

Sodio ioduro

1%

-28-

Sodio tungstato

0,0015% .

I componenti a), b) e c) del reagente furono usati secondo la procedura descritta nell'esempio 7.

Furono preparati reagenti analoghi aventi la stessa composizione sopra riportata ma in cui il componente c) conteneva lo 0,0015% di sodio tetraborato o, rispettivamente, lo 0,0075% di sodio molibdato, invece dello 0,0015% di sodio tungstato, le concentrazioni percentuali del sodio tetraborato e del sodio molibdato essendo sempre riferite a 2,5 ml di soluzione acquosa del liofilizzato.

Anche detti reagenti furono impiegati per l'identificazione dell'antigene HBsAg nel tessuto epatico umano, secondo la procedura dell'esempio 7.

Esempio 9

Per l'identificazione istochimica di qualsiasi tipo di antigene su 50 sezioni di tessuto umano venne preparato un reagente coniglio-specifico contenente:

- a') una soluzione 1:100 in PBS di frammenti Fc di immunoglobulina di coniglio coniugate con β -D-galattosidasi da Escherichia Coli: 2,5 ml; e
- b') un componente liofilizzato da disciogliersi prima dell'uso in acqua distillata a dare 2,5 ml di una soluzione acquosa della composizione seguente:

5-Br-4-Cl-3-indolil- β -D-galattoside	0,44 g/l	-29-
Magnesio cloruro	0,9 mM/l	
Sodio ioduro	1%	
Sodio tungstato	0,0015%	

I componenti a') e b') del reagente furono usati, seguendo procedure analoghe a quelle descritte negli esempi 1 e 7, per l'identificazione di insulina umana in pancreas umano, caseina umana in tessuto mammario umano, antigene di superficie di epatite B (HBsAg) in tessuto epatico umano, lisozima umano in intestino tenue umano, mioglobina umana in muscolo scheletrico umano, e glucagone umano in pancreas umano, usando, in tutti i casi, un antisiero originato in coniglio cioè, rispettivamente, antisiero anti-insulina originato in coniglio, antisiero anti-caseina originato in coniglio, antisiero anti-HBsAg originato in coniglio, antisiero anti-lisozima originato in coniglio, antisiero anti-mioglobina originato in coniglio ed antisiero anti-glucagone originato in coniglio.

Furono preparati analoghi reagenti coniglio-specifici aventi la stessa composizione sopra riportata ma in cui il componente b') conteneva lo 0,0015% di sodio tetraborato o, rispettivamente, lo 0,0075% di sodio molibdato invece dello 0,0015% di sodio tung-

stato, le concentrazioni percentuali di sodio tetraborato e di sodio molibdato essendo sempre riferite a 2,5 ml di soluzione acquosa del liofilizzato. Detti reagenti furono impiegati per l'identificazione di tutti gli antigeni menzionati in precedenza in questo esempio, seguendo procedure analoghe a quelle descritte negli esempi 1 e 7.

Esempio 10

Per l'identificazione istochimica di un antigene su 50 sezioni di tessuto umano fu preparato un reagente capra-specifico avente la stessa composizione del reagente descritto nell'esempio 9 ma contenente frammenti Fc di immunoglobuline di capra coniugate con β -D-galattosidasi, invece che frammenti Fc di immunoglobuline di coniglio coniugate con β -D-galattosidasi.

Furono inoltre preparati reagenti simili ma contenenti frammenti Fc di immunoglobuline di pecora coniugate con β -D-galattosidasi o, rispettivamente, frammenti Fc di immunoglobuline di topo coniugate con β -D-galattosidasi, invece che frammenti Fc di immunoglobuline di coniglio coniugate con β -D-galattosidasi.

Ciascun reagente venne impiegato per l'identificazione della mioglobina umana in muscolo scheletrico.

umano e dell'antigene di superficie di epatite B (HBsAg) in tessuto epatico umano, seguendo procedure analoghe a quelle descritte negli esempi 1 e 7 ma usando antisiero anti-mioglobina e, rispettivamente, antisiero anti-HBsAg originati, rispettivamente, in capra, in pecora, o in topo.

-31-

RIVENDICAZIONI

- 1) Metodo citochimico immunoenzimatico per l'identificazione di antigeni in tessuti caratterizzato dal fatto che si usa come marcante β -D-galattosidasi.
- 2) Metodo citochimico immunoenzimatico secondo la rivendicazione 1 nel quale l'identificazione degli antigeni nei tessuti viene ottenuta attraverso la formazione di un prodotto insolubile e colorato generato per azione del marcante β -D-galattosidasi su un substrato cromogeno specifico, e nel quale metodo il marcante β -D-galattosidasi è legato all'antigene da identificare tramite un legante specifico.
- 3) Metodo citochimico immunoenzimatico secondo le rivendicazioni 1 e 2 nel quale la β -D-galattosidasi è β -D-galattosidasi microbica.
- 4) Metodo citochimico immunoenzimatico secondo la rivendicazione 3 nel quale la β -D-galattosidasi

microbica è β -D-galattosidasi da Escherichia coli.

- 5) Metodo citochimico immunoenzimatico secondo la rivendicazione 2 nel quale il legante specifico che lega la β -D-galattosidasi all'antigene da identificare comprende un anticorpo specifico per l'antigene stesso.
- 6) Metodo citochimico immunoenzimatico secondo la rivendicazione 2 nel quale il legante specifico che lega la β -D-galattosidasi all'antigene da identificare comprende un anticorpo specifico per l'antigene stesso ed un sistema di coniugazione in grado di dare un β -D-galattosidasi coniugato.
- 7) Metodo citochimico immunoenzimatico secondo la rivendicazione 6 nel quale il β -D-galattosidasi-coniugato è un anti-anticorpo β -D-galattosidasi-coniugato.
- 8) Metodo citochimico immunoenzimatico secondo la rivendicazione 6 nel quale il β -D-galattosidasi coniugato è un sistema Biotina-Avidina β -D-galattosidasi-coniugato.
- 9) Metodo citochimico immunoenzimatico secondo le rivendicazioni 2-4 nel quale il substrato cromogeno specifico è un derivato β -D-galattosidico.
- 10) Metodo secondo la rivendicazione 9 nel quale il

derivato β -D-galattosidico è un derivato indolil-
- β -D-galattosidico. -33-

- 11) Metodo secondo la rivendicazione 10 nel quale il derivato indolil- β -D-galattosidico è il 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galattoside.
- 12) Metodo secondo la rivendicazione 9 nel quale il derivato β -D-galattosidico è un naftil- β -D-galattoside.
- 13) Metodo secondo la rivendicazione 12 nel quale il naftil- β -D-galattoside è il 6-bromo-2-naftil- β -D-galattoside.
- 14) Metodo secondo le rivendicazioni 1-9 caratterizzato dal fatto che quando si usa come substrato cromogeno un derivato indolil- β -D-galattosidico secondo le rivendicazioni 10-11, un agente azo-copulante può essere opzionalmente presente.
- 15) Metodo secondo le rivendicazioni 1-9 caratterizzato dal fatto che quando si usa come substrato cromogeno un derivato naftil- β -D-galattosidico secondo le rivendicazioni 12-13, un agente azo-copulante è presente come reagente addizionale.
- 16) Metodo secondo le rivendicazioni 14 e 15 nel quale l'agente azo-copulante è p-rosanilina esaazotata.
- 17) Metodo secondo le rivendicazioni 14 e 15 nel qua-

- le l'agente azo-copulante è scelto nel gruppo consistente di Fast-Blue VB, Fast-Blue BB, Fast-Blue RR e Fast-Garnet GBC.
- 18) Metodo secondo le rivendicazioni 1-9 caratterizzato dal fatto che, quando si usa come substrato cromogeno un derivato indolil- β -D-galattosidico secondo le rivendicazioni 10-11, un agente ossidante o di trasferimento di elettroni può essere opzionalmente presente.
- 19) Metodo secondo la rivendicazione 18 nel quale l'agente ossidante o di trasferimento di elettroni comprende il metosolfato di fenazina.
- 20) Metodo secondo la rivendicazione 18 nel quale l'agente ossidante o di trasferimento di elettroni comprende un sale di tetrazolio.
- 21) Metodo secondo la rivendicazione 20 nel quale il sale di tetrazolio è scelto nel gruppo consistente di p-nitro blu tetrazolio cloruro e tetranitro blu tetrazolio cloruro.
- 22) Metodo secondo la rivendicazione 18 nel quale l'agente ossidante o di trasferimento di elettroni è una coppia ionica red-ox.
- 23) Metodo secondo la rivendicazione 22 nel quale la coppia ionica red-ox comprende $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ioni o $\text{Ce}^{2+}/\text{Ce}^{4+}$ ioni.

- 24) Metodo secondo la rivendicazione 23 nel quale la coppia ionica $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ è fornita dai rispettivi cianuri complessi o sali solfato.
- 25) Metodo secondo la rivendicazione 24 nel quale i cianuri complessi sono un ferrocianuro alcalino ed un ferricianuro alcalino.
- 26) Metodo secondo la rivendicazione 25 nel quale il ferrocianuro ed il ferricianuro alcalini sono potassio ferrocianuro e potassio ferricianuro.
- 27) Metodo secondo la rivendicazione 23 nel quale la coppia ionica $\text{Ce}^{2+}/\text{Ce}^{4+}$ è fornita dai rispettivi sali solfato.
- 28) Metodo secondo la rivendicazione 22 nel quale la coppia ionica red-ox è scelta in un gruppo consistente di $\text{I}^-/\text{VO}_4^{3-}$, I^-/VO_3^- , $\text{I}^-/\text{WO}_4^{2-}$, $\text{I}^-/\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$, $\text{I}^-/\text{MO}_4^{2-}$ e $\text{I}^-/\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$.
- 29) Metodo secondo la rivendicazione 28 nel quale le coppie ioniche ivi menzionate sono fornite dai rispettivi sali con metalli alcalini o alcalino-terrosi.
- 30) Reagente per l'esecuzione di un metodo citochimico immunoenzimatico per la identificazione degli antigeni nei tessuti caratterizzato dal fatto che la β -D-galattosidasi è usata come marcante, comprendente, come componenti

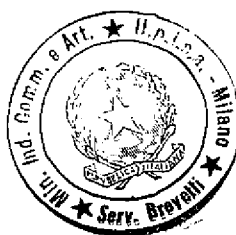
essenziali, a) un anticorpo specifico per l'antigene da determinare, b) β -D-galattosidasi o un β -D-galattosidasi coniugato, e c) un substrato cromogeno specifico per la β -D-galattosidasi e in grado di formare un prodotto insolubile e colorato per azione della β -D-galattosidasi.

- 31) Reagente per l'esecuzione di un metodo citochimico immunoenzimatico per la identificazione degli antigeni nei tessuti caratterizzato dal fatto che la β -D-galattosidasi è usata come marcante, comprendente, come componenti essenziali, a') un anti-anticorpo coniugato con β -D-galattosidasi, e b') un substrato cromogeno specifico per la β -D-galattosidasi e in grado di formare un prodotto insolubile e colorato per azione della β -D-galattosidasi.
- 32) Reagente secondo ciascuna delle rivendicazioni 30 e 31 nel quale la β -D-galattosidasi è come definita nelle rivendicazioni 3 e 4.
- 33) Reagente secondo ciascuna delle rivendicazioni 30, 31 e 32 nel quale il substrato cromogeno specifico per la β -D-galattosidasi è come definito nelle rivendicazioni 9-13.
- 34) Reagente secondo le rivendicazioni 30, 32 e 33

nel quale il β -D-galattosidasi coniugato previsto come componente b) nella rivendicazione 30 è come definito nelle rivendicazioni 7 e 8.

- 35) Reagente secondo le rivendicazioni 31, 32 e 33 nel quale l'anti-anticorpo coniugato con β -D-galattosidasi previsto come componente a") nella rivendicazione 31 è un anticorpo anti-coniglio o anti-capra o anti-pecora o anti-topo.
- 36) Reagente secondo ciascuna delle rivendicazioni 30-35 contenente un agente azo-copulante come definito nelle rivendicazioni 15-17 quale componente addizionale.
- 37) Reagente secondo ciascuna delle rivendicazioni 30-36 contenente un agente ossidante o di trasferimento di elettroni come definito alle rivendicazioni 19-29 quale componente addizionale.

FARMITALIA CARLO ERBA S.p.A.



l'Ufficiale Rogante
Pietro Masetti

DESCRIZIONE

Titolo: "METODO E REAGENTI PER IMMUNOCITOCHIMICA"

La presente invenzione ha per oggetto un metodo citochimico immunoenzimatico per l'identificazione di antigeni in tessuti nel quale la β -D-galattosidasi è usata come tracciante.

L'invenzione comprende anche i reagenti per l'esecuzione di detto metodo.

Anticorpi marcati con enzimi e sostanze fluorescenti vengono comunemente usati in immunoistochimica per evidenziare la localizzazione degli antigeni nei tessuti (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 47:200-202, 1941; J. Immunol. 45:159-170, 1942; J. Exp. Med. 91:1-13, 1950; Arch. Pathol. Lab. Med. 102:113-121, 1978; J. Clin. Pathol. 27:14-20, 1974).

Tuttavia, l'immunolocalizzazione per mezzo di enzimi ha acquisito recentemente maggiore diffusione poichè offre ai patologi alcuni vantaggi ben definiti rispetto all'immunofluorescenza. Questi vantaggi comprendono la maggiore stabilità, il miglior contrasto e dettaglio dei preparati colorati, la stabilità dei vetrini, la salvaguardia del tessuto circostante e, per la maggior parte degli antigeni, l'impiego di materiale preparato con procedimenti standardizzati di fissaggio ed inclusione per microscopia ottica.

A motivo di detti vantaggi, i metodi immunoenzimatici -2- risultano essere metodi altamente sensibili e precisi così che fra le tecniche immunoistochimiche, quelle istochimiche immunoenzimatiche sono oggi le più usate in patologia diagnostica. I metodi citochimici immunoenzimatici, in particolare istochimici, hanno fornito importanti informazioni in patologia renale, per esempio, nello studio di malattie batteriche e virali, nella fisiopatologia del sistema immunitario come pure della secrezione ormonale.

Inoltre sono stati evidenziati rivelatori specifici di determinate malattie e tipi di cellule ottenendo significative informazioni riguardo alla istogenesi e differenziazione di tumori.

Una grande quantità di prodotti cellulari, fra cui enzimi, ormoni steroidei e polipeptidici, immunoglobuline, antigeni dello sviluppo oncogeno, antigeni virali ed altre proteine cellulari, sono stati messi in evidenza in sezioni di tessuto congelate o sottoposte convenzionalmente a tecniche di fissaggio ed inclusione, utilizzando le metodiche summenzionate.

Più estese applicazioni di questi metodi comprendono, per esempio, l'evidenziazione di varie classi di immunoglobuline nei tumori di origine linforeticolare e nei processi linfoproliferativi atipici, l'identi-

ficazione di ormoni polipeptidici nei tumori endocrini

-3-

e l'evidenziazione di vari rivelatori tumorali come

l'antigene carcinoembrionico e l' α -fetoproteina in

condizioni neoplastiche e preneoplastiche.

Un conciso sommario di alcune applicazioni delle tec-

niche immunoenzimatiche in istopatologia è riportato

in Human Pathology, 12, 590-596 (1981).

Vi sono elencati non meno di 70 possibili campi di

applicazione.

La possibilità di identificare in cellule e tessuti,

routinariamente fissati ed inclusi in paraffina, una

grande varietà di segnalatori, alcuni dei quali spe-

cifici per una determinata malattia ed altri addirit-

tura eziologici, offre al patologo nuovi criteri

obiettivi di diagnosi al posto dei tradizionali pa-

rametri, spesso soggettivi, puramente morfologici.

La perossidasi rappresenta normalmente l'enzima a

più larga diffusione in immunocitochimica [Am. J.

Clin. Pathol. 71: 483-488, 1979]. Benchè, da una par-

te quest'enzima offra vantaggi come notevole stabi-

lità, possibilità di utilizzare un substrato insolu-

bile ad alta definizione e di formare catene

costituite da strati multipli di anticorpi con tipi

di legami esclusivamente immunologici (ad es. il si-

stema perossidasi-antiperossidasi, PAP), diversi

svantaggi sono emersi durante l'uso di tali metodi

-4-

raggruppati sotto il termine comune di "immunoperoxidasi".

Perossidasi e pseudoperoxidasi endogene sono presenti in alcuni tessuti e possono condurre a falsi risultati positivi; il substrato cromogeno più largamente

usato: 3,3',4,4'-diaminobenzidina tetracloridrato (DAB) possiede un'elevata azione carcinogena.

[Registry of toxic effects of Chemical Substances -

Ed. NIOSH - U.S. Dept. of Health and Human Services -

Cincinnati - 1980] e diventa sempre più difficile

trovare in commercio un composto ad alto grado di

purezza [J. Histochem. N. 28, pagg. 191-192 (1980)].

La soluzione usata per evidenziare la perossidasi è in-

stabile e deve essere preparata soltanto pochi minu-

ti prima dell'uso [Stenberger L.A.: Immunocytochemi-

stry - 2nd Edition - John Wiley and Sons - New York -

1979].

Inoltre, il substrato cromogeno della perossidasi mostra una colorazione intensamente marrone

contro uno sfondo marrone chiaro, cosa che pone talvolta seri problemi nella determinazione del preparato e può portare a risultati positivi erronei.

Sono stati proposti substrati alternativi per perossidasi od altri enzimi come, per esempio, glucosio

ossidasi e fosfatasi alcalina, ma sinora non sono stati ottenuti risultati paragonabili a quelli forniti dal sistema perossidasi + DAB, specialmente perchè molti metodi portano alla formazione di composti cromogeni solubili nei solventi organici utilizzati per disidratare e purificare i preparati, oppure meno sensibili nel rivelare gli antigeni tissutali. Noi abbiamo trovato che l'impiego di β -D-galattosidasi come tracciante permette di ovviare agli svantaggi comuni alle tecniche citochimiche immunoenzimatiche note, in particolare al metodo citochimico immunoperossidasi.

Conseguentemente, la presente invenzione ha per oggetto un metodo citochimico immunoenzimatico per l'identificazione di antigeni nei tessuti, particolarmente tessuti umani, caratterizzato dal fatto che l'enzima β -D-galattosidasi viene impiegato come tracciante.

Secondo l'invenzione l'identificazione degli antigeni nei tessuti si ottiene tramite la formazione di un prodotto insolubile e colorato generato per azione della β -D-galattosidasi su uno specifico substrato cromogeno.

Più precisamente l'invenzione ha per oggetto un metodo per l'identificazione di antigeni in tessuti

comprendente il legare l'enzima β -D-galattosidasi all'antigene da identificare tramite qualsiasi possibile legante specifico ed il rivelare l'attività della β -D-galattosidasi per mezzo della reazione con uno specifico substrato in grado di fornire, per azione della β -D-galattosidasi, un prodotto insolubile e colorato.

L'enzima β -D-galattosidasi usato nel metodo dell'invenzione può essere qualsiasi β -D-galattosidasi di origine microbica, benchè esso sia preferibilmente, β -D-galattosidasi da *Escherichia coli*.

Secondo l'invenzione la β -D-galattosidasi può essere legata all'antigene da identificare tramite qualsiasi tipo di legante specifico. In particolare, per esempio, qualsiasi tecnica di marcatura o di coniugazione già descritta per perossidasi nei metodi immunoperoxidasici, può essere utilizzata per legare la β -D-galattosidasi all'antigene da rivelare.

Secondo la tecnica preferita, detto antigene viene fatto reagire con un primo anticorpo specifico per l'antigene stesso e che, a sua volta, viene legato alla β -D-galattosidasi o direttamente o tramite qualsiasi sistema specifico di coniugazione in grado di dare un coniugato specifico con β -D-galattosidasi.

Un opportuno coniugato con β -D-galattosidasi può essere, in particolare, per esempio, un anti-anticorpo

enzima-coniugato del tipo descritto, per esempio, in FEBS Lett. 95, 311 (1978) o in Am. J. Clin. Pathol. 71, 483 (1979), oppure un sistema biotina-avidina enzima coniugato, in qualunque delle sue possibili configurazioni, per esempio del tipo riportato in J. Histochem. Cytochem. vol. 27, n. 8, 1131 (1979). Preferibilmente lo stadio della reazione dell'antigene da identificare con il primo anticorpo specifico per l'antigene stesso ed il successivo stadio o stadi che portano a stabilire un ponte fra detto specifico anticorpo e la β -D-galattosidasi, vengono eseguiti consecutivamente.

Per evidenziare l'attività della β -D-galattosidasi, secondo il metodo dell'invenzione può essere usato qualsiasi substrato cromogeno che sia specifico per l'enzima β -D-galattosidasi e che, in aggiunta, sia in grado di fornire, per azione della β -D-galattosidasi, un prodotto di reazione colorato, insolubile e stabile. Il prodotto che si origina da detto substrato cromogeno per azione della β -D-galattosidasi, oltre ad essere colorato e stabile, deve essere insolubile o nei solventi acquosi o nei solventi organici comunemente usati per trattare i tessuti in istologia, essendo preferibilmente insolubile in ambedue i tipi di solventi suddetti sia acquosi che organici.

Preferibilmente, il substrato cromogeno specifico per -8-

la β -D-galattosidasi è solubile negli stessi solventi.

Questo substrato cromogeno con specificità per la β -D-galattosidasi può essere qualsiasi derivato β -D-galattosidico che, una volta scisso dall'enzima, sia in grado di produrre una sostanza colorata, insolubile e stabile come sopra specificato.

Esempi di substrati cromogeni particolarmente utili secondo il metodo dell'invenzione sono, per esempio, alcuni derivati indolil- e naftil- β -D-galattosidici.

Substrati particolarmente preferiti sono i derivati indolil- β -D-galattosidici e, fra questi, è più particolarmente preferito il 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galattoside.

Fra i derivati naftil- β -D-galattosidici il 6-bromo-2-naftil- β -D-galattoside è uno dei preferiti.

Per evidenziare l'attività della β -D-galattosidasi può essere talvolta necessario far reagire il substrato cromogeno in presenza di uno o più reagenti addizionali che possono essere, per esempio, copulanti, ossidanti od agenti di trasferimento di elettroni.

Così, per esempio, quando si usa come substrato cromogeno un derivato naftil- β -D-galattosidico, per rivelare l'attività enzimatica si richiede la presenza di un opportuno azo-copulante il quale azo-co-

pulante può anche essere opzionalmente presente nel reattivo di rivelazione dell'attività allorchè si impiega un cromogeno indolil- β -D-galattosidico.

Azo-copulanti opportuni possono essere, per esempio, p-rosanilina esaazotata, Fast Blue VB, BB e RR, Fast farnet GBC e simili, essendo particolarmente preferita la p-rosanilina esaazotata.

Inoltre, per accelerare la reazione catalizzata dall'enzima, in particolare quando si usa un substrato indolil- β -D-galattosidico, nel mezzo di reazione può anche essere opzionalmente presente un ossidante od un agente di trasferimento di elettroni.

Agenti ossidanti o di trasferimento di elettroni possono essere, purchè appropriati, tutti quelli noti come agenti ossidanti o di trasferimento di elettroni in chimica organica ed inorganica, con preferenza generalmente per gli agenti inorganici.

Esempi di agenti ossidanti o di trasferimento di elettroni preferiti sono, in particolare, fenazina metosolfato, sali di tetrazolio oppure qualsiasi coppia ionica red-ox appropriata.

Un sale di tetrazolio opportuno può essere, per esempio, il cloruro di p-nitro-blu-tetrazolio oppure il cloruro di tetranitro-blu-tetrazolio.

Una coppia ionica red-ox opportuna può essere, per

esempio, scelta nel gruppo delle coppie ioniche

$\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, $\text{Ce}^{2+}/\text{Ce}^{4+}$, $\text{I}^{-}/\text{VO}_4^{3-}$, $\text{I}^{-}/\text{VO}_3^{-}$, $\text{I}^{-}/\text{WO}_4^{2-}$,

$\text{I}^{-}/\text{MoO}_4^{2-}$, $\text{I}^{-}/\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$ e simili.

Coppie del tipo $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, in particolare, possono

essere fornite, e.g., dai rispettivi cianuri complessi

o sali solfato; cianuri complessi sono preferibilmente

ferrocianuri/ferricianuri alcalini, in particolare
potassio ferrocianuro/ferricianuro.

Coppie $\text{Ce}^{2+}/\text{Ce}^{4+}$ sono preferibilmente fornite dai ri-
spettivi sali solfato.

Secondo il metodo dell'invenzione i campioni di tessu-
to possono essere preparati mediante qualsiasi pro-
cedura nota, e.g. procedimenti di fissaggio, inclu-
sione e congelamento comunemente usati in istochi-
mica.

Per esempio, tessuti fissati con formalina ed inclu-
si in paraffina possono essere esaminati molto fa-
cilmente col metodo dell'invenzione.

L'esame dei campioni può essere eseguito con ogni
normale microscopio ottico con ingrandimenti di
20-800 volte.

L'impiego dell'enzima β -D-galattosidasi e di opportuni
substrati cromogeni specifici permette di ovviare,
come già detto, agli svantaggi che si incontrano im-
piegando, e.g., perossidasi.

In particolare, per esempio, i problemi causati dalla presenza nei campioni di tessuto di perossidasi e pseudoperossidasi endogene, che, come anche detto precedentemente, costituiscono una grande limitazione dei metodi immunoistochimici perossidasi, vengono ovviati nel metodo dell'invenzione sia perchè l'enzima β -D-galattosidasi è normalmente assente dai tessuti umani, sia perchè, in ogni caso, il campo di pH per l'attività della β -D-galattosidasi umana è completamente differente dal campo di pH per l'attività della β -D-galattosidasi microbica usata nel metodo dell'invenzione: il "range" di pH per l'attività della β -D-galattosidasi umana è circa 5,5-6 mentre e.g., il "range" di pH di attività della β -D-galattosidasi dell'*Escherichia coli* è circa 7,0-7,5.

Inoltre la β -D-galattosidasi viene inattivata in meno di un minuto a circa 55°C [The Enzymes 1960 2nd Ed. pagg. 409-430 Vol. 4 Ed.: P.D. BOYER, H. LARDY, K. MYRBÄCK, Academic Press - New York] la quale è una temperatura che si raggiunge normalmente durante i convenzionali procedimenti di inclusione.

Grazie all'assenza di interferenza da parte di β -D-galattosidasi endogene, i problemi della colorazione di fondo che insorgono con le perossidasi comunemente impiegate a motivo dell'attività perossidasi-

-simile nei tessuti, non si incontrano con la β -D-ga- -12-
lattosidasi.

La β -D-galattosidasi microbica non produce colorazio-
ne di fondo nei tessuti dei mammiferi e reagisce con
i substrati cromogeni disponibili creando profili
morfologici altamente contrastati e caratteristici.
Le colorazioni ottenute sono assai meglio definite
e distinte di quelle usualmente ottenibili con le
tecniche perossidasiche anche in vista del fatto che
la maggior parte dei substrati cromogeni utilizzati per
la β -D-galattosidasi permette di ottenere un fondo
quasi totalmente incolore. Ne consegue che la visua-
lizzazione ed il riconoscimento dei siti di immuno-
reattività specifica sono grandemente facilitati.
Ciò implica una aumentata sensibilità per il metodo con
 β -D-galattosidasi oggetto dell'invenzione e lo
rende specialmente utile per l'esame di tessuti
con lesioni emorragiche od infiammatorie.
In aggiunta, i reagenti usati per le reazioni isto-
logiche della β -D-galattosidasi in particolare per e-
sempio, i cromogeni indolil β -D-galattosidici prefe-
ribilmente usati, non sono conosciuti come carcinogeni
a differenza della diaminobenzidina, substrato ad
elevato contrasto largamente usato per la colorazio-
ne della perossidasi.

Inoltre, i reattivi usati per eseguire il metodo del- -13-

l'invenzione sono stabili e producono sezioni che sono esse pure permanentemente stabili e che richiedono l'uso di un semplice microscopio ottico normale.

Grazie ai vantaggi brevemente riportati sopra, il metodo β -D-galattosidasi-immunocitochimico dell'invenzione è dotato di un elevatissimo grado di precisione e sensibilità, che sta alla pari almeno con quello delle tecniche perossidasiche, mentre, nello stesso tempo, è privo degli svantaggi che caratterizzano queste ultime tecniche.

A motivo dell'elevata sensibilità, il metodo dell'invenzione permette di raggiungere risultati ottimali anche nella localizzazione di antigeni su materiali fissati ed inclusi routinariamente nei quali l'antigenicità residua è soltanto una frazione di quella del tessuto congelato.

Benchè con il metodo dell'invenzione non sia di norma necessario un pretrattamento dei campioni di tessuto, tuttavia, allo scopo di aumentare ulteriormente la sensibilità della tecnica, un pretrattamento, e.g. secondo Heydermann [J. Clin. Pathol. 32, 971-978 (1979)], può essere talvolta utile per eliminare possibili leggere interferenze delle perossidasi endogene e/o del ferro tissutale.

Il metodo dell'invenzione permette di identificare una grande varietà di prodotti cellulari e, in particolare, un grande numero di rivelatori, molti dei quali specifici per determinate malattie ed alcuni addirittura eziologici, i quali prodotti cellulari e rivelatori possono essere, per esempio, quelli previamente indicati in questa domanda di brevetto.

L'invenzione ha per oggetto anche un reagente per l'esecuzione del metodo β -D-galattosidasi-immunoistochimico sopra descritto.

Detto reagente comprende, come componenti essenziali, a) un anticorpo specifico per l'antigene da identificare, b) β -D-galattosidasi od uno specifico β -D-galattosidasi coniugato e c) un substrato cromogeno specifico per la β -D-galattosidasi ed in grado di fornire, per azione della β -D-galattosidasi, un prodotto insolubile e colorato.

Tale reagente può ulteriormente comprendere un certo numero di componenti addizionali come, per esempio, un azo-copulante, un ossidante oppure un agente di trasferimento di elettroni ed un tampone.

Nel reagente descritto le caratteristiche dei vari componenti sono quelle previamente indicate esponendo il metodo dell'invenzione, essendo componenti preferiti quelli che nella suddetta domanda di brevetto

sono pure stati indicati come preferiti. Così, per esempio, in alcune formulazioni preferite, il reagente dell'invenzione comprende, come componenti essenziali, a) un anticorpo specifico per l'antigene da identificare, b) uno specifico β -D-galattosidasi-coniugato e c) un indolil- β -D-galattoside come substrato cromogeno.

Nelle suddette formulazioni preferite il β -D-galattosidasi coniugato è, preferibilmente, un anti-anticorpo coniugato con la β -D-galattosidasi oppure un sistema Biotina-Avidina coniugato con la β -D-galattosidasi.

L'indolil β -D-galattoside usato come substrato cromogeno è, preferibilmente, in particolare, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galattoside.

I seguenti esempi illustrano ma non limitano in alcun modo l'invenzione.

Esempio 1

L'insulina umana nel pancreas umano fu identificata con la seguente procedura.

Si utilizzò tessuto pancreatico umano fissato in formalina al 10% tamponata con tampone fosfato ed incluso routinariamente in paraffina. Gli strati sezionati di paraffina vennero immersi in fisiologica tamponata con tampone fosfato (PBS) a pH 7,2 e trattati per 5 minuti con H_2O_2 7,5%, indi per 5 minuti con

acido periodico 2,28% ed alfine per 2 minuti con -16-

NaBH_4 0,002% [J. Clin. Pathol. 32, 971-978 (1979)]

Dopo alcuni lavaggi in PBS, le sezioni furono incubate a 4°C per una notte con un antisiero di coniglio anti-h-insulina diluito 1/1000 con PBS.

Dopo lavaggio in PBS, anticorpi immunoglobulinici anti-coniglio prodotti in asini e coniugati a β -D-galattosidasi da Escherichia coli secondo il procedimento riportato in FEBS Letters 95, 311 (1978), diluiti 1/30 in PBS contenente l'1% di siero suino normale, furono aggiunti alle sezioni. Dopo 30 minuti a temperatura ambiente, i tessuti furono lavati in PBS e l'attività enzimatica rivelata con una soluzione ottenuta sciogliendo in PBS a pH 7,2:

5-Br-4-Cl-3-indolil- β -D-galattoside	0,44 g/l
Magnesio cloruro	1,1 mM/l
Potassio ferricianuro	3,0 mM/l e
Potassio ferrocianuro	3,0 mM/l.

Il trattamento con questa soluzione di rivelazione fu eseguito incubando per 1 ora a 37°C. Dopo lavaggio i nuclei vennero contrassegnati colorandoli con rosso neutro e le sezioni vennero disidratate e montate in Eukitt^R.

I tessuti furono esaminati con un microscopio ottico (Leitz Orthoplan) a 200 ingrandimenti. I luoghi

di reazione positiva apparivano intensamente colorati in blu. La colorazione positiva era molto evidente in quanto il fondo era incolore ed i nuclei apparivano colorati in rosso. I risultati furono confrontati con quelli ottenuti negli stessi tessuti trattati con lo stesso antisiero anti-insulina e poi esaminati secondo la procedura perossidasi PAP [Sternberger - J. Histochem. Cytochem. 18, 315 (1970)]. Il risultato con la procedura perossidasi fu una reazione positiva di intenso colore marrone. La colorazione positiva era però meno evidente e meno nitida di quella ottenuta con il metodo β -D-galattosidasico a causa della leggera colorazione marrone del fondo. Così con il metodo/ β -D-galattosidasi permette di ottenere risultati di colorazione molto migliori di quelli ottenuti con il procedimento perossidasi PAP.

Esempio 2

Impiegando il procedimento dell'esempio 1 ma sostituendo gli appropriati antisieri, tutti prodotti nel coniglio, all'antisiero anti-insulina, vennero identificati anche i seguenti antigeni:

caseina umana in tessuto mammario umano;

antigeni di superficie di epatite B (HBsAg) in fegato umano;

lisozima umano in intestino tenue umano;

mioglobina umana in muscolo scheletrico umano;

-18-

e

glucagone umano in pancreas umano.

Furono raggiunti risultati analoghi a quelli ottenuti nell'esempio 1.

Esempio 3

La mioglobina umana nel muscolo scheletrico fu identificata con la seguente procedura. Si impiegò tessuto di muscolo scheletrico umano fissato in formalina al 10% in tampone fosfato ed incluso secondo routine in paraffina. Le sezioni paraffiniche vennero portate in PBS ed incubate per una notte a 4°C con un antisiero anti-mioglobina di coniglio (Behringwerke) diluito 1/500 con PBS. Dopo lavaggio in PBS fu seguita la procedura dell'esempio 1 e furono ottenuti gli stessi risultati.

Procedendo analogamente ed impiegando gli antisieri opportuni furono identificati i seguenti antigeni:

insulina umana in pancreas umano;

caseina umana in tessuto mammario umano;

antigene di superficie di epatite B (HBsAg) in fegato umano;

lisozima umano in intestino tenue umano;

glucagone umano in pancreas umano.

Esempio 4

L'antigene di superficie di epatite B (HBsAg) nel fegato umano fu identificato come segue. Fu impiegato tessuto di fegato umano fissato ed incluso come descritto nell'esempio 1. Si seguì la procedura dell'esempio 1 sostituendo all'antisiero anti-insulina un antisiero di coniglio anti HBsAg (Behringwerke) diluito 1/500 con PBS.

Si usò inoltre una soluzione PBS di rivelazione come quella impiegata nell'esempio 1 ma priva di potassio ferrocianuro e di potassio ferricianuro. Con questa procedura si ottenne lo stesso tipo di risultato ottenuto nell'esempio 1.

Procedendo analogamente ma impiegando gli antisieri opportuni vennero identificati i seguenti antigeni:

insulina umana in pancreas umano;

caseina umana in tessuto mammario umano;

lisozima umano in intestino tenue umano;

mioglobina umana in muscolo scheletrico umano;

glucagone umano in pancreas umano.

Esempio 5

Il lisozima umano nell'intestino tenue umano fu identificato con la seguente procedura. Si impiegò tessuto di intestino tenue umano fissato ed inglobato come descritto nell'esempio 1. Si seguì la procedura dell'esempio 1 sostituendo all'antisiero anti-

insulina un-antisiero di coniglio-anti-lisozi- -20-

(DAKO) diluito 1/500 con PBS ed usando come soluzione di rivelazione una soluzione di PBS a pH 7,2 contenente:

5-Br-4-Cl-3-indolil- β -D-galattoside 0,44 g/l

Magnesio-cloruro 1,1 mM/l

Potassio-ioduro 20,0 g/l

Sodio tungstato 1,0 g/l

Furono raggiunti risultati analoghi a quelli ottenuti nell'esempio 1.

Procedendo analogamente ed impiegando gli antisieri opportuni furono identificati i seguenti antigeni:

insulina umana in pancreas umano;

caseina umana in tessuto mammario umano;

antigene di superficie di epatite B (HBsAg) in fegato umano;

mioglobina umana in muscolo scheletrico umano;

glucagone umano in pancreas umano.

Esempio 6

La caseina umana fu identificata in tessuto mammario umano con la seguente procedura. Fu usato tessuto mammario umano congelato. Vennero preparate delle sezioni di tessuto in criostato e ^{vennero} trattate come nell'esempio 1 utilizzando come sostituto dell'antisiero anti-insulina un antisiero di coniglio anti-caseina

diluito 1/1000 in PBS.

-21-

Vennero conseguiti risultati analoghi a quelli ottenuti nell'esempio 1.

Procedendo analogamente con tessuti congelati ed impiegando gli opportuni antisieri vennero identificati i seguenti antigeni:

insulina umana in pancreas umano;

antigene di superficie di epatite B (HBsAg) in fegato umano;

lisozima umano in intestino tenue umano;

mioglobina umana in muscolo scheletrico umano;

glucagone umano in pancreas umano.

RIVENDICAZIONI

- 1) Metodo citochimico immunoenzimatico per l'identificazione di antigeni in tessuti caratterizzato dal fatto che si usa come tracciante β -D-galattosidasi.
- 2) Metodo citochimico immunoenzimatico secondo la rivendicazione 1 nel quale l'identificazione degli antigeni nei tessuti viene ottenuta attraverso la formazione di un prodotto insolubile e colorato generato per azione del tracciante β -D-galattosidasi su un substrato cromogeno specifico, e nel quale metodo la β -D-galattosidasi tracciante è legata all'antigene da identificare tramite un

legante specifico.

-22-

- 3) Metodo citochimico immunoenzimatico secondo le rivendicazioni 1 e 2 nel quale la β -D-galattosidasi è β -D-galattosidasi microbica.
- 4) Metodo citochimico immunoenzimatico secondo la rivendicazione 3 nel quale la β -D-galattosidasi microbica è β -D-galattosidasi da *Escherichia coli*.
- 5) Metodo citochimico immunoenzimatico secondo la rivendicazione 2 nel quale il legante specifico che lega la β -D-galattosidasi all'antigene da identificare comprende un anticorpo specifico per l'antigene stesso.
- 6) Metodo citochimico immunoenzimatico secondo la rivendicazione 2 nel quale il legante specifico che lega la β -D-galattosidasi all'antigene da identificare comprende un anticorpo specifico per l'antigene stesso ed un sistema specifico di coniugazione in grado di dare uno specifico β -D-galattosidasi coniugato.
- 7) Metodo citochimico immunoenzimatico secondo la rivendicazione 6 nel quale il β -D-galattosidasi-coniugato è un anti-anticorpo β -D-galattosidasi-coniugato.
- 8) Metodo citochimico immunoenzimatico secondo la rivendicazione 6 nel quale il β -D-galattosidasi co-

niugato è un sistema Biotina-Avidina β -D-galatto-

-23-

sidasi-coniugato.

- 9) Metodo citochimico immunoenzimatico secondo le rivendicazioni 2-4 nel quale il substrato cromo-
geno specifico è un derivato β -D-galattosidico.
- 10) Metodo secondo la rivendicazione 9 nel quale il
derivato β -D-galattosidico è un derivato indolil-
- β -D-galattosidico.
- 11) Metodo secondo la rivendicazione 10 nel quale il
derivato indolil- β -D-galattosidico è il 5-bromo-
-4-cloro-3-indolil- β -D-galattoside.
- 12) Metodo secondo la rivendicazione 9 nel quale il
derivato β -D-galattosidico è un naftil- β -D-galat-
toside.
- 13) Metodo secondo la rivendicazione 12 nel quale il
naftil- β -D-galattoside è il 6-bromo-2-naftil- β -D-
-galattoside.
- 14) Metodo secondo le rivendicazioni 1-9 caratterizza-
to dal fatto che quando si usa come substrato cro-
mogeno un derivato indolil- β -D-galattosidico se-
condo le rivendicazioni 10-11, un agente azo-copu-
lante può essere opzionalmente presente.
- 15) Metodo secondo le rivendicazioni 1-9 caratterizza-
to dal fatto che quando si usa come substrato cro-
mogeno un derivato naftil- β -D-galattosidico secon-

do le rivendicazioni 12-13, un agente azo-copulante è presente come reagente addizionale.

-24-

16) Metodo secondo le rivendicazioni 14 e 15 nel quale l'agente azo-copulante è p-rosanilina esaazotata.

17) Metodo secondo le rivendicazioni 14 e 15 nel quale l'agente azo-copulante è scelto nel gruppo consistente di Fast-Blue VB, Fast-Blue BB, Fast-Blue RR e Fast-farnet GBC.

18) Metodo secondo le rivendicazioni 1-9 caratterizzato dal fatto che, quando si usa come substrato cromogeno un derivato indolil- β -D-galattosidico secondo le rivendicazioni 10-11, un agente ossidante o di trasferimento di elettroni può essere opzionalmente presente.

19) Metodo secondo la rivendicazione 18 nel quale l'agente ossidante o di trasferimento di elettroni comprende il metosolfato di fenazina.

20) Metodo secondo la rivendicazione 18 nel quale l'agente ossidante o di trasferimento di elettroni comprende un sale di tetrazolio.

21) Metodo secondo la rivendicazione 20 nel quale il sale di tetrazolio è scelto nel gruppo consistente di p-nitro blu tetrazolio cloruro e tetranitro blu tetrazolio cloruro.

22) Metodo secondo la rivendicazione 18 nel quale

l'agente ossidante o di trasferimento di elettroni è una coppia ionica red-ox.

23) Metodo secondo la rivendicazione 22 nel quale la

coppia ionica red-ox comprende $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ioni o $\text{Ce}^{2+}/\text{Ce}^{4+}$ ioni.

24) Metodo secondo la rivendicazione 23 nel quale la

coppia ionica $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ è fornita dai rispettivi cianuri complessi o sali solfato.

25) Metodo secondo la rivendicazione 24 nel quale i

cianuri complessi sono un ferrocianuro alcalino ed un ferricianuro alcalino.

26) Metodo secondo la rivendicazione 25 nel quale il

ferrocianuro ed il ferricianuro alcalini sono potassio ferrocianuro e potassio ferricianuro.

27) Metodo secondo la rivendicazione 23 nel quale la

coppia ionica $\text{Ce}^{2+}/\text{Ce}^{4+}$ è fornita dai rispettivi sali solfato.

28) Metodo secondo la rivendicazione 19 nel quale la

coppia ionica red-ox è scelta in un gruppo consistente di $\text{I}^-/\text{VO}_4^{3-}$, I^-/VO_3^- , $\text{I}^-/\text{WO}_4^{2-}$, $\text{I}^-/\text{Mo}_4^{2-}$, $\text{I}^-/\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$.

29) Reattivo per l'esecuzione di un metodo citochimico

immunoenzimatico secondo ciascuna delle rivendicazioni precedenti 1-28 comprendente, come compo-

nenti essenziali, a) un anticorpo specifico per -26-

l'antigene da identificare, b) β -D-galattosidasi

oppure uno specifico β -D-galattosidasi coniuga-

to e c) un substrato cromogeno specifico per

la β -D-galattosidasi ed in grado di fornire, per

azione della β -D-galattosidasi, un prodotto in-

solubile e colorato.

30) Reattivo secondo la rivendicazione 29 nel quale

la β -D-galattosidasi è come definita nelle riven-

dicazioni 3) e 4).

31) Reattivo secondo le rivendicazioni 29 e 30 nel

quale il β -D-galattosidasi coniugato è come

definito nelle rivendicazioni 7 ed 8.

32) Reattivo secondo le rivendicazioni 29-31 nel

quale il substrato cromogeno specifico per la

β -D-galattosidasi è come definito nelle rivendi-

cazioni 9-13.

33) Reattivo secondo le rivendicazioni 29-32 conte-

nente un agente azo-copulante come definito nelle

rivendicazioni 15-17 quale componente addizionale.

34) Reattivo secondo le rivendicazioni 29-33 conte-

nente un agente ossidante o di trasferimento di

elettroni come definito alle rivendicazioni 19-26

quale componente addizionale.

35) Un metodo secondo la rivendicazione 1 sostanzial-

mente come precedentemente descritto con riferi-
mento ad ognuno degli esempi.

-27-

36) Un reattivo secondo la rivendicazione 29 sostan-
zialmente come precedentemente descritto con
riferimento ad ognuno degli esempi.