



CONFEDERAZIONE SVIZZERA

UFFICIO FEDERALE DELLA PROPRIETÀ INTELLETTUALE

⑪ CH 677 032 A5

⑤① Int. Cl.⁵: G 01 N 33/68**Brevetto d'invenzione rilasciato per la Svizzera ed il Liechtenstein**

Trattato sui brevetti, del 22 dicembre 1978, fra la Svizzera ed il Liechtenstein

⑫ **FASCICOLO DEL BREVETTO** A5

⑳ Numero della domanda: 5001/87

㉔ Data di deposito: 21.12.1987

㉓ Priorità: 23.12.1986 IT 22817/86

㉔ Brevetto rilasciato il: 28.03.1991

④⑤ Fascicolo del
brevetto pubblicato il: 28.03.1991㉗ Titolare/Titolari:
Eniricerche S.p.A., Milano (IT)㉗ Inventore/Inventori:
Nuzzolo, Carlo Antonio, Roma (IT)
Bernardi, Adriano, Monterotondo (Roma) (IT)
Pessi, Antonello, Roma (IT)
Verdini, Antonio Silvio, Monterotondo (Roma) (IT)㉗ Mandatario:
R. A. Egli & Co., Patentanwälte, Zürich⑤④ **Procedimento per la determinazione di anticorpi antisporozoita di P. Falciparum nel sangue umano.**

⑤⑦ Si fanno incubare campioni di sangue umano e/o suoi derivati con un coniugato antigene sintetico-enzima capace di formare con gli anticorpi antisporozoita presenti nei campioni un complesso stabile anticorpo-antigene sintetico-enzima, senza disattivare l'attività enzimatica. Si fa legare l'anticorpo di detto complesso alle proteine adsorbite e/o chimicamente legate ad un supporto solido. Infine, si determina l'attività enzimatica del complesso legato alle proteine mediante aggiunta di un substrato enzimatico incolore capace di dare, in caso di positività, un prodotto colorato.

Un kit diagnostico per l'esecuzione di questo procedimento impiega il coniugato antigene sintetico-enzima e proteine.

Il procedimento, per la sua economicità, specificità e rapidità, è particolarmente utile nelle indagini epidemiologiche della malaria e nella valutazione dell'efficacia di un vaccino antimalaria.

Descrizione

La presente invenzione riguarda un nuovo procedimento immunoenzimatico per la diagnosi della malaria nel sangue umano.

Più in particolare, la presente invenzione riguarda un metodo per la rivelazione e dosaggio di anticorpi antisporoziota di *P. falciparum* nel sangue, siero e/o plasma umano.

La malaria rappresenta una delle malattie parassitarie più gravi e colpisce, ogni anno, centinaia di milioni di individui, soprattutto, nelle regioni tropicali dell'Asia, Africa e America causando un'elevata mortalità infantile.

L'agente eziologico della malaria è un protozoo appartenente al genere *Plasmodium* che viene trasmesso all'uomo attraverso la puntura della zanzara *Anopheles*.

Fra le centinaia di specie di *Plasmodium* esistenti in natura, solo quattro sono patogene per l'uomo: *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*.

Quest'ultimo, in particolare, rappresenta la specie più diffusa e causa la maggior parte della morbidità e mortalità associate alla malaria.

La determinazione di anticorpi antisporoziota nel sangue di individui sospetti costituisce un parametro clinico essenziale per la diagnosi della malaria e per la valutazione dell'efficacia di un vaccino anti-malarico.

Generalmente, la diagnosi delle infezioni malariche viene condotta mediante esame microscopico del sangue o mediante metodi immunologici basati su misure di fluorescenza (IFA), di radioattività (IRMA) e di attività enzimatica (EIA).

L'analisi microscopica del sangue si presenta tuttavia, difficile e inadatta per un'indagine epidemiologica in cui vengono esaminati centinaia di migliaia di campioni.

Poco adatti risultano, inoltre, i metodi immunologici IRMA e IFA che, oltre a richiedere lunghi tempi di esecuzione, sono complicati dai numerosi stadi richiesti e dall'impiego di sostanze instabili e nocive per l'uomo.

Fra i metodi immunoenzimatici EIA, quello più comunemente impiegato, è il saggio ELISA (Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay) che comprende:

- a) il fissare, per assorbimento o mediante legame chimico covalente, un antigene naturale o sintetico ad un supporto solido;
- b) il bloccare i siti residui del supporto con una proteina opportuna;
- c) l'incubare l'antigene legato al supporto con il siero in esame e,
- d) l'aggiungere, in successione, un anticorpo antiimmunoglobulina umana legato ad un enzima rivelatore ed un substrato incolore dell'enzima che, in caso di positività del siero, dà luogo ad un prodotto colorato.

Questo saggio, pur consentendo di superare alcuni degli inconvenienti dei metodi IRMA ed IFA mediante l'impiego di sostanze stabili e non radioattive,

richiede, tuttavia, lunghi tempi di operazione (circa 6 ore) e l'uso di reattivi, quali gli anticorpi antiimmunoglobulina-enzima, ottenibili mediante procedimenti complessi e dispendiosi.

- 5 Pertanto, nella tecnica vi è l'esigenza di un metodo di diagnosi rapido, economico e sensibile, utile per un sondaggio di massa nelle aree in cui la malaria è endemica o nelle aree dove si deve esercitare un controllo accurato per prevenire o localizzare focolai infettivi.

- 10 Detta esigenza viene soddisfatta, secondo la presente invenzione, mediante un nuovo metodo immunoenzimatico che opera con un coniugato antigene sintetico-enzima, capace di formare con gli anticorpi antisporoziota un complesso anticorpo-antigene-enzima stabile, e con le proteine che legano avidamente l'anticorpo antisporoziota di detto complesso.

- 15 Pertanto, costituisce uno scopo della presente invenzione, un metodo immunoenzimatico per la rivelazione e dosaggio di anticorpi antisporoziota di *P. falciparum* in campioni di sangue umano e/o suoi derivati che comprende: l'incubare detti campioni in presenza di un coniugato antigene sintetico-enzima capace di formare con gli anticorpi antisporoziota un complesso stabile anticorpo-antigene sintetico-enzima, il legare l'anticorpo antisporoziota di detto complesso alle proteine adsorbite e/o legate covalentemente ad un supporto solido ed infine il determinare l'attività enzimatica del complesso legato alle

- 20 proteine mediante aggiunta di un substrato enzimatico incolore capace di dare, in caso di positività, un prodotto colorato.

- Costituisce inoltre uno scopo della presente invenzione l'uso di detto coniugato antigene sintetico-enzima rivelatore per la preparazione di un kit per la diagnosi della malaria.

- Il coniugato antigene sintetico-enzima, adatto per il metodo secondo la presente invenzione è formato da un polipeptide sequenziale, capace di riconoscere e legare gli anticorpi antisporoziota, e da un enzima.

- 25 In particolare, secondo la presente invenzione, il polipeptide sequenziale è (Asn-Ala-Asn-Pro)_n, dove n assume un valore da 3 a 40, preferibilmente da 10 a 20, e riproduce esattamente il segmento polipeptidico della proteina circumsporoziotica naturale della membrana dello sporozoota di *P. falciparum*.

- La presenza, in detto polipeptide, di due soli gruppi chimici funzionali terminali, NH₂ e COOH, lo rende particolarmente adatto alla preparazione del coniugato secondo la presente invenzione, in quanto consente la formazione di un legame covalente stabile, fra il polipeptide ed enzima, senza pregiudicare l'attività catalitica dell'enzima stesso.

- Detto polipeptide viene preparato in forma pura e in resa elevata, secondo il procedimento descritto nella domanda di Brevetto Europea Publ. No. 209 643, mediante polimerizzazione del tetrapeptide HCl-H-Asn-Ala-Asn-Pro-OPCP, in solvente polare inerte, in presenza di una base organica terziaria.

- Enzimi utili per la preparazione del coniugato della presente invenzione vengono scelti fra quelli capa-

ci di agire su un substrato cromogeno. Esempi di detti enzimi sono la perossidasi, α -galattosidasi e fosfatasi alcalina. Preferibilmente viene impiegata perossidasi.

In accordo con la presente invenzione, il coniugato antigene sintetico-enzima viene preparato mediante un procedimento che comprende:

1) l'ossidare l'enzima purificato in una soluzione 0,1 M di NaHCO_3 , in presenza di un agente ossidante, quale ad esempio metaperiodato di sodio, a una temperatura ambiente ($20-25^\circ\text{C}$), al buio, per circa 2 ore;

2) l'aggiungere a detta soluzione il polipeptide sciolto in NaHCO_3 (pH 9,2) in un rapporto molare polipeptide/enzima pari a circa 40/1 e il mantenere la soluzione risultante, a temperatura ambiente, al buio, per circa 16 ore;

3) l'aggiungere alla soluzione ottenuta un agente riducente, quale ad esempio NaBH_4 ed infine,

4) il separare il coniugato polipeptide-enzima.

In particolare, secondo una forma di attuazione della presente invenzione, viene preparato un coniugato in cui il polipeptide è $(\text{Asn-Ala-Asn-Pro})_{17}$ e l'enzima è perossidasi. Il grado di coniugazione, cioè il rapporto molare tra polipeptide ed enzima in detto coniugato, è 0,9-0,92, prossimo al valore atteso (1) per il coniugato puro.

L'attività specifica della perossidasi, determinata spettrofotometricamente a 405 nm come riportato da H. Galloti (1979) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 17, 1-7, è il 75% di quella dell'enzima non coniugato.

In accordo con il procedimento secondo la presente invenzione, detto coniugato viene incubato, in soluzione tampone per circa 20-30 minuti, con un campione di sangue intero, siero o plasma umani.

Successivamente, la miscela di reazione viene posta ad incubare per altri 20-30 minuti su un supporto solido sul quale è stata adsorbita e/o legata covalentemente la proteina A.

Detta proteina, come è noto, lega avidamente le immunoglobuline umane, ad eccezione delle IgM ed IgG₃ e quindi forma con l'anticorpo antiparozita legato al coniugato antigene-enzima, un complesso stabile.

Supporti solidi utili per il metodo secondo la presente invenzione, sono materiali polisaccaridici, tipo cellulosa e agarosio, e materiali plastici.

Al termine della reazione e dopo opportuni lavaggi, le miscele vengono addizionate con una soluzione contenente il substrato enzimatico cromogeno ed H_2O_2 e, dopo 2-3 minuti, si osserva lo sviluppo di colore.

Nel caso in cui venga analizzato il sangue intero, la miscela iniziale, prima di essere addizionata alla Proteina A viene centrifugata o filtrata per eliminare il materiale in sospensione.

Il valore di soglia, cioè la quantità minima di siero positivo, che genera uno sviluppo di colore osservabile ad occhio nudo è stato, rispettivamente, di 0,1 μl e 0,4 μl per due sieri indagati.

Nessuna colorazione viene osservata, inoltre, per il bianco, costituito dalla miscela contenente il

coniugato senza campione di sangue e/o suoi derivati, per il siero e plasma di individui sani, per il sangue intero non malarico, emolizzato e non, e per le γ -globuline (Globuman-Berna).

Ciò indica una completa assenza di interferenze nel metodo secondo la presente invenzione.

La possibilità di esecuzione rapida, circa 60 minuti contro le 6 ore del saggio ELISA e, l'uso di un numero ridotto di reattivi, solo antigene-enzima e proteine, costituiscono un particolare vantaggio del metodo secondo la presente invenzione.

Un vantaggio notevole di detto metodo consiste, inoltre, nella possibilità di determinare e dosare gli anticorpi antiparozita nel sangue intero. Ciò è dovuto all'elevata stabilità del coniugato della presente invenzione nei confronti delle proteasi presenti nel sangue.

Inoltre, il metodo secondo la presente invenzione è assolutamente specifico, infatti, tutti i campioni rilevatisi positivi nei saggi IRMA, IFA ed ELISA, analizzati con detto metodo hanno confermato la loro positività.

Pertanto, il metodo secondo la presente invenzione, è particolarmente adatto per uno studio epidemiologico della malaria e, in particolare, nel sondaggio di massa dell'infezione malarica in zone mancanti di presidi e strutture sanitarie.

Gli esempi sperimentali che seguono sono illustrativi e non limitativi per l'invenzione stessa.

Esempio 1

Preparazione del coniugato $(\text{Asn-Ala-Asn-Pro})_{17}$ -Perossidasi.

L'enzima perossidasi (Sigma) è stato purificato e liofilizzato prima di essere coniugato al peptide. 10 mg di enzima puro (E) sono stati quindi sciolti in 1 ml di NaHCO_3 0,1M ed ossidati con 1 ml di NaJO_4 (metaperiodato di sodio) 16 mM, a temperatura ambiente ($20-25^\circ\text{C}$), al buio, per 2 ore.

Al termine di detto periodo di tempo, alla miscela di reazione sono stati addizionati 1 ml di NaHCO_3 (pH 9,2) contenenti 70 mg del peptide $(\text{Asn-Ala-Asn-Pro})_{17}$ (P) in un rapporto molecolare peptide/enzima pari a 40/1.

La miscela così ottenuta è stata trasferita, quantitativamente, in una pipetta Pasteur chiusa all'estremità con della lana di vetro e, addizionata con 500 mg di Sephadex®G-25 (Pharmacia Uppsala) in polvere e mantenuta a temperatura ambiente, al buio, per altre 16 ore.

La miscela di reazione, eluita dalla pipetta, è stata addizionata con 150 μl di NaOH 0,1mM contenenti 5 mg/ml di NaBH_4 e, dopo 30 minuti, con 450 μl della stessa soluzione.

Dopo circa 1 ora, la miscela contenente il coniugato enzima-peptide (E-P) ed il peptide (P) e l'enzima (E) non reagiti, è stata equilibrata con tampone Sodio Acetato 5 mM pH 4,4, in una colonna di Sephadex G-10, previamente equilibrata con lo stesso tampone. Successivamente, la miscela è stata caricata su una colonna (0,9 x 10 cm) di CM-cellulosa equilibrata con Sodio Acetato 5 mM pH 4,4 ed eluita

con tampone sodio acetato 65 mM pH 4,4 e desalificata su colonna Sephadex G10 equilibrata con acqua distillata. L'eluato contenente il composto E-P e l'enzima non reagito è stato liofilizzato.

Il peptide non reagito è stato eluito precedentemente con il tampone di carica e la sua integrità è stata analizzata mediante spettroscopia ad infrarosso.

I risultati ottenuti hanno mostrato uno stesso spettro per il peptide eluito e per quello di partenza. Pertanto è stato possibile concludere che nessuna alterazione del peptide si era verificata durante la reazione di coniugazione e che quindi, il peptide legato all'enzima era integro.

Il grado di coniugazione E-P, cioè il rapporto molare tra peptide ed enzima nel coniugato, è stato determinato calcolando l'incremento dei residui amminocidici Asn, Ala e Pro nella miscela contenente E-P + E libero, rispetto all'enzima iniziale E.

L'analisi degli amminoacidi è stata effettuata, dopo idrolisi acida, di E-P+E ed E con HCl 6N a 110°C, per 24 ore, in fiale chiuse, mediante un analizzatore automatico di amminoacidi Beckman.

Poiché la composizione amminoacidica dei due isoenzimi perossidasi (B e C), presenti in E iniziale, è nota (Shannan L.M. et al. (1966) J.Biol.Chem. 241, 2166) è stato possibile calcolare, per un rapporto molecolare P:E pari ad 1 corrispondente al coniugato E-P puro, un incremento teorico di Asp, Ala e Pro, rispettivamente di 63%, 68% e 100%.

Sono stati trovati per i suddetti amminoacidi degli incrementi del 58%, 62% e 90%, corrispondenti ad un rapporto molare P:E di 0,90-0,92, circa pari a quello calcolato per il coniugato puro.

L'attività specifica residua dell'enzima Perossidasi legata al peptide, determinata spettrofotometricamente a 405 nm con ABTS (acido 2,2'-azino-di(3-etil-benzotiazolin-solfonico) 1,7 nM e H₂O₂ 0,83 mM in tampone fosfato 50 mM pH 6,0 [H.Gallati J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 17 1-7 (1979)] era circa il 75% di quella dell'enzima iniziale.

Esempio 2

Sono stati impiegati per questo saggio 8 sieri malarici, il plasma eparinizzato di 4 donatori sani, il siero di 3 individui sani ed un campione di sangue intero malarico ottenuto miscelando, in un rapporto volumetrico 1:1, il siero malarico con il sangue intero emolizzato e non emolizzato di un individuo sano.

A 100 µl di tampone fosfato 10 mM pH 7,5 contenente NaCl 0,15 M, Tween-20 0,05% (PBS-T) e 200 ng del coniugato E-P, sono stati addizionati da 1 a 5 µl di sangue o plasma o siero di individui sani oppure 10 µl di PBS-T contenenti rispettivamente 0,05 - 0,1 - 0,2 - 0,4 - 0,8 - 1,6 - 3,2 µl di siero di individui malarici.

Le soluzioni sono state mantenute a temperatura ambiente per 15-20 minuti.

Nel caso di sangue intero, la soluzione è stata centrifugata o filtrata per eliminare il materiale in sospensione.

Successivamente, sono state trasferite dette soluzioni in puntali di plastica da micropipetta incolori e trasparenti contenenti alla punta lana di vetro e so-

pra questa Proteina A-Sepharosio CL - 4B (Pharmacia-Uppsala), in quantità pari a circa 6 µl di letto, prelavati con PBS-T.

Le soluzioni sono state percolate, per gravità, in un tempo di 20-30 minuti, le microcolonne sono state lavate 3 volte con 200 µl ciascuno di PBS-T e 2 volte con 200 µl ciascuno di PBS (tampone senza Tween-20).

Successivamente, ad ogni microcolonna, sono stati addizionati 200 µl di soluzione di substrato 4-cloro-1 naftolo (BIORAD) e H₂O₂ preparato mescolando al momento 1 volume di 4-cloro-1-naftolo (BIORAD) (3 mg/ml in metanolo freddo) e 5 volumi di una soluzione di 6 µl H₂O₂ al 30% (v/v) aggiunti a 10 ml di PBS. Dopo 2-3 minuti, è stato osservato lo sviluppo di un colore blu intenso per i campioni positivi.

Il valore di soglia, cioè la quantità minima di siero positivo che genera una banda blu facilmente osservabile, è risultato di 0,1 µl-0,4 µl per due sieri positivi esaminati.

La specificità del saggio è stata verificata su un siero malarico positivo (sviluppo di una banda blu con EP), utilizzando in una prova 200 ng di enzima libero senza EP; in un'altra prova un forte eccesso (3 µg) (circa 100 volte) di P libero in competizione con il coniugato E-P presente (200 ng). Al termine della reazione non è stato osservato alcuno sviluppo di colore.

Nessuna colorazione è stata osservata inoltre nella microcolonna, per il bianco, formato dalla miscela di reazione con E-P senza aggiunta di sangue, siero o plasma; per il siero o plasma di individui sani, per il sangue intero non malarico, nè per le γ-globuline umane (Globuman-Berna) saggate in quantità equivalente a circa 6 µl di siero.

Ciò indicava una completa assenza di interferenze nel saggio impiegante il coniugato E-P.

La stabilità dell'enzima perossidasi legato al peptide (E-P) è stata determinata, spettrofotometricamente, effettuando prelievi da 0 a 2 ore, da una soluzione di PBS-T (100 µl) contenente 200 ng di E-P e addizionata con campioni di siero o plasma.

I risultati ottenuti mostravano dopo 2 ore un'attività perossidasi invariata.

Rivendicazioni

1. Procedimento per la determinazione e dosaggio di anticorpi antiparozitoi di *P. falciparum* in campioni di sangue umano e/o suoi derivati caratterizzato dal fatto di:

- incubare detti campioni con un coniugato antigene sintetico-enzima capace di formare con gli anticorpi antiparozitoi presenti nei campioni un complesso stabile anticorpo-antigene sintetico-enzima, senza disattivare l'attività enzimatica;
- legare l'anticorpo di detto complesso alle proteine adsorbite e/o chimicamente legate ad un supporto solido e, infine,
- determinare l'attività enzimatica del complesso legato alle proteine mediante aggiunta di un substrato enzimatico incolore capace di dare, in caso di positività, un prodotto colorato.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, ca-

ratterizzato dal fatto che, l'antigene sintetico è il polipeptide sequenziale:

(Asn-Ala-Asn-Pro)_n

5

dove n assume un valore da 3 a 40 e la proteina è la proteina A.

3. Procedimento secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che n varia da 10 a 20.

4. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che, l'enzima viene scelto fra quelli capaci di dare una reazione colorimetrica con un substrato specifico.

10

5. Procedimento secondo la rivendicazione 4, caratterizzato dal fatto che, l'enzima è perossidasi e/o fosfatasi alcalina

15

6. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che, il coniugato viene preparato facendo reagire, in fase omogenea in NaHCO₃, a temperatura ambiente (20–25°C) al buio, l'enzima ossidato con un eccesso molare del polipeptide (Asn-Ala-Asn-Pro)_n dove n ha il significato sopra riportato.

20

7. Procedimento secondo la rivendicazione 6, caratterizzato dal fatto che, il rapporto molare tra polipeptide ed enzima nel coniugato è pari o circa pari a 0,92.

25

8. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che nello stadio a) la reazione viene condotta a temperatura ambiente (20–25°C) per un tempo da 15 a 20 minuti.

30

9. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che, il supporto solido è un materiale polisaccaridico o plastico.

10. Procedimento secondo la rivendicazione 9, caratterizzato dal fatto che, supporti polisaccaridi sono cellulosa, agarosio e simili.

35

11. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che, nello stadio b) la reazione viene condotta a temperatura ambiente (20–25°C) per un periodo da 20 o 30 minuti.

40

12. Kit diagnostico per l'esecuzione del procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto di contenere il coniugato antigene sintetico-enzima definito nella rivendicazione 1 e proteine.

45

50

55

60

65

5