



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

UIBM

DOMANDA NUMERO	101994900395086
Data Deposito	10/10/1994
Data Pubblicazione	10/04/1996

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	K		

Titolo

METODO DIAGNOSTICO PER LA DETERMINAZIONE DELLA INFERTILITA' MASCHILE DEI MAMMIFERI BASATO SU UN PROCEDIMENTO DI ESTRAZIONE DELLA PROTEASI ACROSINA-SIMILE E DELLA PROTEASI BENZAMIDINA-RESISTENTE E SULLA DETERMINAZIONE DELLE LORO ATTIVITA' ENZIMATICHE

DESCRIZIONE

94 A 000647

dell'invenzione avente per titolo

"Metodo diagnostico per la determinazione della infertilità maschile dei mammiferi basato su un procedimento di estrazione della proteasi acrosina-simile e della proteasi benzamidina-resistente e sulla determinazione delle loro attività enzimatiche"

a nome : CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

di nazionalità : italiana

con sede in : Piazzale Aldo Moro 7, 00185 Roma RM

Inventori : John S. CHEN, Cristiana SENSINI,
 Giulia COLLODEL, Paola PIOMBONI,
 Baccio BACCETTI, Maria Giulia MENESINI

----000----

La presente invenzione riguarda un metodo diagnostico semplice, efficace e preciso per la determinazione della infertilità maschile dei mammiferi, basato su un procedimento di estrazione della proteasi acrosina-simile e della proteasi benzamidina-resistente e sulla determinazione delle loro attività enzimatiche.

È noto che l'acrosina gioca un ruolo importante nella fecondazione (McRorie, R.A. and Williams, W.L., Annual Rev. Biochem. 43:777, 1974; Zaneveld, D.J.D. et al, Human Reprod. 6:1265, 1991) ed è stato ripetutamente affermato che l'attività dell'acrosina può essere un importante parametro per diagnosticare la fertilità (Sharma, R. et al, Fertility and Sterility, 60:881, 1993; Goodpasture J.C. et al, J. Androl. 8:267, 1987). Esiste anche l'opinione

contraria per cui l'acrosina da sola non è ben correlata con la fertilità (Kruger T.F. et al, Arch. Androl. 20:237, 1988; Chen, J.S. et al, Zygote 1:309, 1993). Per questa ragione, le analisi cliniche incontrano delle difficoltà nel mettere a fuoco la causa principale della infertilità maschile (Gerhard I. et al, Androl. 21:146, 1989).

Più di recente, la RhoMed Inc., Albuquerque, MN, ha ottenuto un brevetto statunitense (US-A-5.250.417) su di un "metodo per l'analisi della reazione acrosomiale" (metodo AR) sottolineando che l'abilità dello spermatozoo a compiere la reazione acrosomiale caratterizza la capacità di fecondare l'uovo. Questo test richiede solo due o tre ore di lavoro manuale ed è assai più veloce della analisi attualmente in vigore.

Nell'ambito degli studi che hanno condotto alla presente invenzione è stato altresì preso in considerazione il metodo convenzionale, complicato, laborioso ed impreciso (Goodpasture J.C. et al, J. Androl., 1:16, 1979; Gerhard I. et al, Andrologia, 21, 146, 1989; Sharma, R. et al 60:881, 1993) delle analisi cliniche volto a identificare la causa della infertilità maschile. Poichè la base biochimica della fecondazione è praticamente ignota (Green, D.P.L., Human Reprod., 8:91, 1993), abbiamo effettuato studi finalizzati al chiarimento dei fattori coinvolti direttamente o indirettamente nella fecondazione.

In letteratura numerosi sono i metodi per l'estrazione delle proteasi acrosomiali e vengono principalmente seguiti i metodi di Goodpasture et al (Goodpasture J.C. et al, J. Androl. 1:16, 1979) e

quello di Siegel et al (Siegel M.S. et al Biol. Reprod. 35, 485, 1986).

In generale si basano tutti sulla tecnica nota come estrazione acida normalmente intorno a pH 3 in presenza di detergenti con e senza inibitore(i). I procedimenti sono generalmente complicati, dispersivi e per lo più non danno una buona resa (Kennedy W.P. et al, *J. Androl.*, 10:221-231; Chen et al, *Atti Accademia Fisiocritici, Siena, Serie XV-TOMO XII:137-141, 1993*). Un altro grave difetto di questa metodologia è la perdita di numerosi enzimi proteolitici acrosomiali termolabili (vedi Chen J.S. et al, *Serono Symposium Series, Vol. 75, pag. 225*) che possono essere importanti per la funzione normale degli spermatozoi. Abbiamo pertanto voluto rivedere il procedimento di estrazione tipicamente acrosomiale fattibile per una rapida conclusione compresa la determinazione delle attività enzimatiche delle proteasi contenute nell'estratto. Per questo motivo abbiamo affrontato il tema per individuare quanti tipi di proteasi acrosina-simile sono presenti negli spermatozoi (Menesini Chen, M.G. et al, in *Atti Riunione Annuale TUM (Società Italiana Biochimica), Assisi, 22 Aprile 1994, pag. 4*). Ma il risultato più significativo è quello relativo alla scoperta di una proteasi tipicamente acrosomiale (Chen, J.S. et al, *Serono Symposium Series, Vol. 76:125, 1991*; Chen J.S. et al, *Italian Biochemical Society Transactions, Vol. 3, pag. 439, 1992*) chiamata proteasi benzamidina-resistente per la proprietà di non essere inibita dalla benzamidina (potente inibitore dell'acrosina) (Zahler W.L., Polakoski, K.L., *Biochim. Biophys. Acta, 480:461-468, 1977*).

La sudetta proteasi è stata osservata per la prima volta nel 1990 (Chen, J.S. et al, Sero Symposium Series, Vol. 76:125, 1991); ed è stato subito notato che essa contiene il calcio che è essenziale per l'esplicazione della sua attività proteolitica. Studi successivi hanno dimostrato che questo enzima è presente, oltre che nel bue, nel cinghiale, nel coniglio, nel ratto, nel montone e nell'uomo (Chen J.S. et al, Acta Embryol. Morphol. Expr., n.s. 12:99, 1991; Chen J.S. et al, Zygote 1:309, 1993; Sensini C. et al, The Clinical Biochemist-Reviews, 14 (iv):S45).

Secondo la presente invenzione ed in seguito alla identificazione da noi effettuata di una proteasi tipicamente acrosomiale, la proteasi benzemidina resistente, abbiamo trovato che il rapporto tra l'acrosina-simile e la proteasi benzamidina-resistente ha una buona correlazione con la struttura acrosomiale e con la fecondazione.

Un oggetto della presente invenzione è quello di fornire un procedimento per l'estrazione delle proteasi acrosomiali acrosina-simile e benzamidina resistente da un campione di sperma, che comprende gli stadi consistenti nel:

- (a) preparare una sospensione/soluzione di campione in tampone da 50 mM a 100 mM a pH 1-11, ad una concentrazione di spermatozoi da 10^6 a 10^8 /mL e lavare per tre volte mediante centrifugazione da 1000 a 3000 xg per 5 minuti;
- (b) sonicare a potenza di 20 W per 1-5 minuti a 0° C;
- (c) regolare il pH della fase così ottenuta a 1-11; e

- (d) centrifugare da 5000 a 10000 xg per 5-35 minuti (ad una temperatura di 4-25° C);
- (e) recuperare il sopranatante.

Un ulteriore oggetto della presente invenzione è quello di fornire un metodo per la diagnosi della infertilità maschile dei mammiferi, che comprende gli stadi consistenti nel:

- (a) estrarre da un campione di sperma una fase contenente le proteasi acrosomiali acrosina-simile e benzamidina-resistente;
- (b) determinare le attività proteolitiche di dette proteasi acrosomiali

- (i) preparando una miscela di incubazione comprendente 600 µL di una soluzione tampone, a pH 6-8,5; 0-200 µL di detta fase contenente le proteasi; 0-50 µL di una soluzione acquosa contenente 150-550 mM di un inibitore; 0-500 µL di una soluzione acquosa allo 0,1-0,5% di un substrato;
 - (ii) sottoponendo la suddetta miscela di incubazione a misurazione spettrofotometrica a 260-450 nm per ricavare, per ciascuna delle proteasi, la velocità iniziale (V_o) mediante la seguente formula:

$$V_o = (V_{\max} - V_{\min})/T$$

in cui ($V_{\max} - V_{\min}$) è la differenza di assorbanza spettrofotometrica e T è il tempo, in minuti, durante il quale si è verificata detta differenza di assorbanza; e

- (c) calcolare il rapporto

$$R = (E)/(E)x$$

in cui (E) è V_o dell'acrosina-simile in assenza di inibitore ed (E)x è V_o della proteasi benzimidina-resistente in presenza di almeno 20 μ L di detta soluzione di inibitore.

Il valore di R utile ai fini della diagnosi secondo la presente invenzione è stato correlato con le osservazioni al microscopio elettronico mediante una valutazione statistica. Ad esempio, nel caso di campioni provenienti da uomini, se $R \geq 1,3$ vi è il 76,9% di probabilità che la posizione dell'acrosoma sia corretta e che il campione sia fertile.

Le attività enzimatiche possono essere determinate usando i substrati sintetici o quelli naturali in presenza o in assenza di inibitore.

Tra gli inibitori che possono venire impiegati nel metodo secondo l'invenzione si possono citare benzamidina, pepstatina, leupeptina ed inibitore della pepsina. Si preferisce soprattutto la benzamidina.

Tra i substrati che possono venire impiegati nel metodo secondo l'invenzione si possono citare substrati sintetici quali BAPNA (p-nitroanilide benzoil-DL-arginina), L1280 (p-nitroanilide glicina) ed il BAEE (etere etilico benzoil-DL-arginina) e substrati naturali quali emoglobina bovina, gelatina, α -caseina, albumina serica bovina e azocaseina. Preferibilmente, il substrato è un substrato sintetico cromogeno.

La scelta del substrato può influenzare la sensibilità ed il tempo di esecuzione delle analisi. Quando la reazione enzimatica

avviene su un substrato sintetico quale il BAPNA, lo spettrofotometro utilizzato deve essere munito del "Time Drive File" e la lettura viene eseguita nel campo visibile (405 nm).

Tra i tamponi che possono venire impiegati nel metodo secondo l'invenzione si possono citare PBS (tampone fosfato salino), TBS (tampone Tris salino), tampone Tris-HCl, tampone acetato, tampone fosfato e tampone HCl-KCl.

Preferibilmente, lo stadio (a) di estrazione delle proteasi acrosina-simile e benzamidina-resistente viene effettuato secondo il procedimento dell'invenzione.

Di conseguenza, secondo l'invenzione, viene fornito un metodo diagnostico per la determinazione della infertilità maschile dei mammiferi che presenta i seguenti vantaggi.

- 1) Il metodo dell'invenzione offre valori aventi una minore probabilità di errore ed è quindi molto preciso.
- 2) Il metodo dell'invenzione è molto rapido in quanto richiede solo un'ora di lavoro manuale.
- 3) Il metodo dell'invenzione è semplice ed efficace.
- 3) Le sostanze usate per le analisi effettuate secondo il metodo dell'invenzione sono stabili e sicure e di facile approvvigionamento.
- 4) Il parametro ottenuto con il metodo dell'invenzione permette di compiere una corretta diagnosi, pari al 76,92% delle probabilità. E questo è un buon risultato.
- 5) Con i metodi della tecnica nota non viene rivelata l'esatta localizzazione dell'acrosoma, contrariamente a quanto avviene con

il metodo secondo l'invenzione.

La presente invenzione verrà ora descritta in maggior dettaglio, a titolo illustrativo e non limitativo, negli esempi che seguono.

Esempio 1

Determinazione del valore di R a partire da un campione di spermatozoi eiaculati di origine umana.

1 - a Il campione viene sospeso in un tampone (5 vol.), preferibilmente PBS (tampone fosfato salino, pH 7,2). Dopo centrifugazione a 1000 xg per 5 minuti (a freddo), il precipitato viene sospeso usando lo stesso tipo di tampone. La stessa operazione viene ripetuta per tre volte (totale). Alla fine dell'operazione di lavaggio, gli spermatozoi vengono sospesi in 1,5 mL di PBS e contati in una camera contaglobuli (camera di Thomas) per la determinazione della concentrazione spermatica.

1 - b Il campione viene sottoposto a sonicazione (potenza 20 W) per 3 minuti (a 0°C) in una provetta di plastica, preferibilmente conica. Il pH del sonicato viene regolato a 2 con 3 N HCl ed il campione viene quindi centrifugato a 13000 rpm (Microfuge) per 15 minuti. Il sopranatante (limpido) viene usato per la successiva determinazione delle attività proteasiche.

1 - c Lo spettrofotometro viene predisposto nel seguente modo: viene selezionato il "Time Drive File" e viene quindi impostata la lunghezza d'onda desiderata (405 nm per il substrato BAPNA ed il tempo di reazione (1 minuto). La reazione viene compiuta in una cuvetta di plastica usa e getta mantenuta ad una temperatura

costante di 37°C. Anche il tampone d'incubazione, preferibilmente 0,2 M Tris Buffer, pH 8,5, ed il substrato, preferibilmente un substrato sintetico cromogeno BAPNA (benzoyl-DL-arginina-p-nitro-anilide) (0,1% in acqua distillata) vengono preriscaldati a 37°C. Il campione viene invece conservato a 0° C e l'inibitore, preferibilmente benzamidina, (7 mg/100 mL) resta a temperatura ambiente. Dopo essersi accertati che il solo tampone ed il substrato non producano un assorbimento maggiore di 0,0015 unità, lo spettrofotometro è pronto per la misurazione. Si prepara quindi la miscela d'incubazione che è costituita come segue nell'ordine da: 600 mL di tampone Tris-HCl 0,2M, pH 8,5; 100 mL di campione; nessun inibitore in caso di (E) e 20 µL di inibitore nel caso (E)x; 330 mL di substrato. Dopo avere ben mescolato per qualche secondo, si inizia la misurazione avendo avuto cura di avere azzerato lo strumento. La curva delle assorbanze del prodotto di idrolisi viene visualizzata sullo schermo, e deve essere di secondo grado (secondo la cinetica enzimatica). Alla fine della misurazione, viene calcolato la V_0 secondo la formula di cui sopra. Ogni tipo di misurazione viene ripetuta per tre volte.

1 - d La media di tre misurazioni con e senza l'inibitore, indicate rispettivamente come (E)x ed (E), permettono di calcolare il valore di R (si veda la formula sopra riportata).

Secondo i nostri dati, il valore di R è un'indice per la situazione dello stato dell'acrosoma presente negli spermatozoi umani. In sintesi, se il valore supera 1,3 si ha il 76,9% di possibilità di

avere un acrosoma normale. Questo implica che lo spermatozoo ha la capacità di compiere la reazione acrosomiale e significa la possibilità di fecondazione [RhoMed Inc. (Albuquerque, MN), US-A-5.250.417].

Esempio 2

Determinazione del valore di R a partire da un campione di spermatozoi eiaculati di toro

2 - a Il campione viene sospeso in un tampone come descritto in 1 - a. Alla fine del lavaggio, il precipitato di spermatozoi viene sospeso in 0,2 vol. di TBS (tampone fosfato salino) e si procede per la determinazione della concentrazione spermatica come descritto in precedenza. Il campione ad una desiderata concentrazione di spermatozoi (si veda più avanti) viene portato a pH 2 usando 3N HCl.

2 - b In una provetta di plastica contenente non più di 6 mL di spermatozoi in TBS (ad una concentrazione pari a $80 \times 10^6/\text{mL}$), viene sottoposto a sonicazione come descritto in 1 - b, tranne che la centrifugazione viene eseguita a 10000 xg per 35 minuti. Il supernatante viene usato per la successiva determinazione delle attività enzimatiche.

Si procede infine come in 1 - c e in 1 - d.

Per il toro, il valore di R è in genere intorno a 1 (pH 2). Se il valore di R è inferiore ad 1,1 la qualità del seme è considerata mediocre.

Esempio 3

Determinazione del valore di R a partire da un campione di spermatozoi epididimali di ratto.

3 - a La raccolta ed il successivo lavaggio e conteggio delle cellule spermatiche possono essere eseguiti come descritto in 1 - a, tranne che la concentrazione di spermatozoi è preferibilmente intorno a $60 \times 10^6/\text{mL}$.

3 - b Viene seguita la procedura descritta in 1 - b sino a portare il pH a 2. La centrifugazione può essere eseguita a 9000 xg per 35 minuti (4°C). Il sopranatante risultante viene usato per la determinazione dell'attività enzimatica.

Si procede infine come in 1 - c e in 1 - d.

Per i ratti, se il valore di R (da epididymis caudae) è superiore a 1,2, il seme è giudicato fertile, se inferiore a questo valore, è considerato scadente e quindi non fertile.

Esempio 4

Determinazione del valore di R a partire da spermatozoi eiaculati congelati di origine umana.

4 - a Viene seguita la procedura descritta in 1 - a, dopo di che i campioni vengono congelati a -25°C (il risultato finale resta invariato anche dopo diversi mesi di congelamento).

4 - b Il campione viene scongelato rapidamente e quindi subito mantenuto in ghiaccio. Il resto della procedura è uguale a quanto descritto in 1 - b.

Si procede infine come in 1 - c e in 1 - d.

La presente invenzione è stata descritta a titolo illustrativo e non limitativo, ma è si intende che varianti e modifiche potranno essere apportate dagli esperti nel ramo senza per questo uscire dal relativo ambito di protezione.

RM 94 A 000647RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per l'estrazione delle proteasi acrosomiali acrosina-simile e benzamidina resistente da un campione di sperma, che comprende gli stadi consistenti nel:

- (a) preparare una sospensione/soluzione di campione in tampone da 50 mM a 100 mM a pH 1-11, ad una concentrazione di spermatozoi da 10^6 a 10^8 /mL e lavare per tre volte mediante centrifugazione da 1000 a 3000 xg per 5 minuti;
- (b) sonicare a potenza di 20 W per 1-5 minuti a 0° C;
- (c) regolare il pH della fase così ottenuta a 1-11; e
- (d) centrifugare da 5000 a 10000 xg per 5-35 minuti (ad una temperatura di 4-25° C);
- (e) recuperare il sopranatante.

2. Metodo per la diagnosi della infertilità maschile dei mammiferi, che comprende gli stadi consistenti nel:

- (a) estrarre da un campione di sperma una fase contenente le proteasi acrosomiali acrosina-simile e benzamidina-resistente;
- (b) determinare le attività proteolitiche di dette proteasi acrosomiali
 - (i) preparando una miscela di incubazione comprendente 600 µL di una soluzione tampone, a pH 6-8,5; 0-200 µL di detta fase contenente le proteasi; 0-50 µL di una soluzione

acquosa contenente 150-550 mM di un inibitore; 0-500 μ L di una soluzione acquosa allo 0,1-0,5% di un substrato;

(ii) sottoponendo la suddetta miscela di incubazione a misurazione spettrofotometrica a 260-450 nm per ricavare, per ciascuna delle proteasi, la velocità iniziale (V_o) mediante la seguente formula:

$$V_o = (V_{\max} - V_{\min})/T$$

in cui ($V_{\max} - V_{\min}$) è la differenza di assorbanza spettrofotometrica e T è il tempo, in minuti, durante il quale si è verificata detta differenza di assorbanza; e

(c) calcolare il rapporto

$$R = (E)/(E)_x$$

in cui (E) è V_o dell'acrosina-simile in assenza di inibitore ed (E)_x è V_o della proteasi benzimidina-resistente in presenza di almeno 20 μ L di detta soluzione di inibitore.

3. Metodo secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che l'inibitore è benzamidina.

4. Metodo secondo la rivendicazione 2 o 3, caratterizzato dal fatto che il substrato è un substrato sintetico cromogeno.

5. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 4, caratterizzato dal fatto che lo stadio (a) di estrazione delle proteasi acrosina-simile e benzamidina-resistente viene effettuato mediante

il procedimento della rivendicazione 1.

p.i. di CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

Dott. Fabio Cavattoni

