

Registro A

Protocollo n° 200894/88



MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

Ufficio Provinciale Industria Commercio e Artigianato di Milano

COPIA DEL VERBALE DI DEPOSITO PER BREVETTO D'INVENZIONE INDUSTRIALE

L'anno 1988 il giorno UNO del mese di APRILE

la Ditta New Scientific Company S.p.A.
~~il Signor~~

di nazionalità italiana con sede
~~residente~~ in Cormano (Milano)

a mezzo mandatari : VITTORIO FARAGGIANA - FRANCO MARTEGANI - CARLA SEGRE JARACH
ed effettivamente domiciliati a agli effetti di legge a Milano - Via BOCCACCIO, 24
presso Ingg. GUZZI e RAVIZZA S.r.l.

ha presentato a me sottoscritto:

- Domanda in bollo per la concessione di un BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

avente per

TITOLO:

"Metodo per la determinazione della presenza di catene leggere libere in campioni di urina, complesso di preparati per l'esecuzione del metodo, e relativo reagente"

Inventor e designato: Leonardo Massaro

Priorità della domanda di brevetto in: ===

corredata di:

- Descrizione in duplo di n. 13 pagine di scrittura.
- Disegni, tavole n. // in duplo.
- Lettera d'incarico - ~~Dichiarazione di mantenimento del diritto di priorità~~ (riserva)
- ~~Documento di priorità e traduzione italiana~~
- ~~Autorizzazione di atto di concessione~~
- Atto di designazione dell'inventore. (riserva)
- Attestazione di versamento sul c/c postale n.00668004 intestato all'Ufficio del Registro tasse e concessioni di Roma di L. 187.000.= emessa dall'Uff. Postale di Milano 28 Il 31.03.1988 n. 797
- Marca da bollo da L. 3.000.- 5.000.-

Il trovato di cui alla presente domanda non costituisce oggetto di altri depositi di uguale contenuto, dovunque effettuati in pari data, da parte del medesimo titolare.

La domanda, le descrizioni ed i disegni sopraelencati sono stati firmati dal richiedente e da me controfirmati e bollati col timbro d'ufficio

IL DEPOSITANTE

Carla Segre Jarach

L'UFFICIALE ROGANTE
Antonio Martinelli

Up. il Direttore

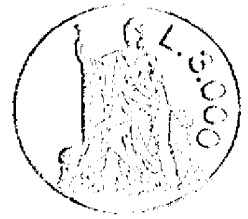
(Benito Boschetto)

Dott. N. Sarlo

Per copia conforme all'originale

«Si precisa che per tale domanda e allegati l'imposta di bollo è stata assolta conformemente alla circolare n° 163/83 dell'U.C.B. e succ. modif., con riserva di eventuali integrazioni che saranno dallo stesso richieste in sede di concessione.»





AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO CENTRALE BREVETTI - ROMA

La Ditta New Scientific Company S.p.A., di nazionalità italiana, con sede a Cormano (Milano), rappresentata dai sottoscritti mandatarî Vittorio FARAGGIANA, Franco MARTEGANI, Carla SEGRE JARACH, iscritti all'Albo rispettivamente con i n° 169-167-297, tutti di Ingg. GUZZI e RAVIZZA s.r.l., con domicilio eletto presso quest'ultima in MILANO, Via Boccaccio 24, domanda la concessione di un brevetto per l'invenzione industriale avente per titolo:

"Metodo per la determinazione della presenza di catene leggere libere in campioni di urina, complesso di preparati per l'esecuzione del metodo, e relativo reagente"

INVENTORE DESIGNATO : Leonardo Massaro

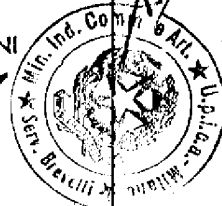
Documentazione allegata:

- a) Descrizione in duplice copia di n. 13 pagine di scrittura;
- b) Lettera d'incarico bollata; (riserva)
- c) Att.ne di vers.to sul C/C/P n.668004 di L. 187.000.=
emessa dall'Uff.Post.di Milano;
- d) Designazione d'inventore; (riserva)
- e) Marca da bollo da L. 5.000.

Milano, - 1 APR. 1988

Dr. Ing. V. FARAGGIANA
iscriz. Albo n. 169

I mandatarî:
V. FARAGGIANA - F. MARTEGANI
C. SEGRE JARACH
(per e per gli altri)



U.P.I.C. MILANO SERVIZIO BREVETTI
01.04.88 020089
Ore _____ Min _____

20089A/88

DESCRIZIONE

del brevetto per invenzione industriale dal titolo:

"Metodo per la determinazione della presenza di catene leggere libere in campioni di urina, complesso di preparati per l'esecuzione del metodo, e relativo reagente"

a nome: New Scientific Company S.p.A.

di nazionalità: italiana

con sede: Cormano (Mi)

Inventore designato: Leonardo Massaro

Depositato il: **1 APR. 1988** con il n°: **20089 A/88**

* * * * *

R I A S S U N T O

Per la determinazione della presenza di catene leggere libere (proteine di Bence Jones) nelle urine è proposto un metodo che prevede di far reagire il campione con un reagente antisiero anti catene leggere libere, dove la presenza di queste ultime è rivelata dalla torbidità del campione reagito. Per confronto con la torbidità di calibratori a concentrazione predeterminata è possibile ricavare valori di analisi quantitativi. Un kit per l'effettuazione dell'analisi comprende reagente antisiero anticatene leggere libere, calibratore e reagente senza antisiero

* * * * *

E' noto che una immunoglobulina è schematicamente composta da due catene pesanti e due catene leggere. La determinazione

della presenza delle catene leggere libere, dette anche proteine di Bence Jones, nelle urine offre un rilevante interesse dal punto di vista diagnostico.

Le catene leggere libere sono presenti in tracce nel siero di soggetti normali, ma sono praticamente assenti nelle urine. La presenza di tali catene leggere nelle urine è indice dell'esistenza di uno stato patologico, particolarmente di natura immunologica.

Per vero, la presenza di catene leggere libere nelle urine presuppone il loro aumento anomalo nel siero del soggetto ma, dato il loro basso peso molecolare, le catene libere leggere passano il filtro glomerulare e non persistono nel sangue. E' dunque necessario operare la indagine indiretta, accertando della loro presenza nelle urine.

La presenza di catene leggere libere nelle urine, che è conseguente all'aumento di esse nel sangue, è associata a patologie di tipo immunologico, che così possono essere riassunte.

- Presenza di catene leggere libere monoclonali: malattie immunoproliferative quali mieloma multiplo, mieloma micromolecolare, macroglobulinemia di Waldenstroms, leucemia linfatica cronica, amiloidosi primitiva.

- Presenza di catene leggere libere policlonali: malattie iperimmuni come il lupus erythematosus, sistemico, artrite reumatoide in fase acuta, amiloidosi secondaria.

I metodi diagnostici basati sull'accertamento della presenza di catene leggere libere nelle urine presentano notevolissimo interesse, ma si scontrano attualmente con le difficoltà di esecuzione di una tale indagine. Attualmente il metodo più seguito prevede una analisi elettroforetica su urina concentrata.

Questa tecnica richiede necessariamente la concentrazione del campione, in ragione delle relativamente piccole quantità percentuali di catene leggere libere nel liquido organico, anche per stati patologici gravi del soggetto. L'esame elettroforetico su campione non concentrato risulta di inaccettabilmente bassa sensibilità e conseguente attendibilità. Il tempo necessario alla concentrazione si somma tuttavia al tempo richiesto dall'analisi elettroforetica, con evidenti inconvenienti. L'analisi condotta su campioni concentrati eleva indubbiamente la attendibilità dei risultati, senza che possa tuttavia essere raggiunta la ragionevole certezza su di essi. Sui campioni risultati sospetti all'elettroforesi risulta pertanto altamente consigliabile condurre tests di immunofissazione o immunoelettroforesi, di cui è nota la laboriosità e il costo, al fine di raggiungere veramente soddisfacenti livelli di sensibilità e quindi di attendibilità dei risultati dell'analisi.

Lo scopo dell'invenzione è di proporre un metodo di accertamento qualitativo e quantitativo della presenza di catene

leggere libere in urina, che possa essere agevolmente eseguito, con alta sensibilità e in tempi estremamente brevi, soprattutto in comparazione con i tempi richiesti nel procedimento di analisi attualmente utilizzati.

Inoltre è scopo dell'invenzione di mettere a disposizione dell'utilizzatore un complesso di sostanze, in forma di kit, adatto per mettere in pratica il proposto metodo diagnostico.

L'invenzione si basa sulla osservazione che una reazione antigene-anticorpo è utilizzabile per la determinazione della presenza di catene libere leggere nelle urine, senza preventiva loro concentrazione, portando a valori di torbidità che permettono di valutare la presenza di tali catene con significativa attendibilità, sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo. In particolare l'invenzione propone un metodo diagnostico basato sull'accertamento della concentrazione di catene leggere nelle urine comprendente le fasi di:

- centrifugare il campione di urine e separare il sovrantante;
- aggiungere al campione un reagente antisiero anti catene leggere libere operando in eccesso di anticorpo;
- valutare la torbidità del campione reagito.

Soprattutto se è richiesto un apprezzamento quantitativo, il metodo prevede di aggiungere il reagente antisiero ad un campione di calibrazione contenente catene leggere libere in quantità predeterminate, per ottenere curve di calibrazione

per la procedura di analisi quantitativa per confronto di torbidità.

L'antisiero anti catene leggere è ottenibile con qualunque dei procedimenti noti a questo fine, generalmente da animale immunizzato con catene leggere libere.

Sono noti due tipi di catene leggere, convenzionalmente nominati kappa e lambda, che possono venire utilizzati per immunizzazione di animali per ottenere antisieri corrispondenti.

Un tale antisiero reagisce con tutti i siti antigenici della catena leggera, compresi quelli che possono definirsi "nascosti", quando la catena leggera è legata alla catena pesante: questo antisiero evidenzia quindi sia le catene leggere legate, sia le catene leggere libere.

E' possibile ottenere un antisiero anti catene leggere libere allontanando dall'antisiero anti catene leggere gli anticorpi rivolti verso i siti antigenici non "nascosti" dalla catena leggera: ciò può essere raggiunto facendo reagire l'antisiero anti catene leggere con immunoglobuline intere, e recuperando gli anticorpi che non hanno reagito. Un tale antisiero reagisce solo con catene leggere libere, rispettivamente di tipi kappa o lambda, e non reagisce con catene leggere legate.

Per meglio chiarire le caratteristiche del metodo secondo l'invenzione, si descriverà qui di seguito come essa possa trovare pratica attuazione.

Un kit di prodotti necessari per condurre l'analisi secondo

l'invenzione comprende tipicamente i seguenti componenti:

a) Reagente antisiero anti catene leggere libere.

Questo reagente è composto da antisiero diluito, ad esempio in queste concentrazioni:

antisiero anti catene leggere kappa libere	20%
antisiero anti catene leggere lambda libere	20%
soluzione di PEG 6000 al 4% in soluzione fisiologica tamponata (PBS) (tampone fosfato pH 7,4	
	60%

E' vantaggiosa l'aggiunta di conservante, quale SodioAzide 0,1%

b) Calibratori

Questi sono utilizzabili come controlli positivi della procedura qualitativa, e come calibratori per la procedura quantitativa.

I campioni utilizzati sono provenienti da pazienti con mieloma micromolecolare secernente. Mancando ogni metodo di riferimento in letteratura, si è eseguita elettroforesi delle proteine urinarie notando la presenza di una cospicua banda successivamente tipizzata con immunofissazione come catene leggere kappa e lambda libere accompagnata da una leggerissima banda di albumina (appena visibile). Si è perciò considerata la quantità di proteine totali come praticamente coincidente con la quantità di catene leggere libere. Il dosaggio delle proteine totali è stata eseguito con metodo di Bradford.

I campioni sono liofilizzati, con aggiunta di conservante (SodioAzide 1%), da diluire per l'uso con acqua distillata, e quindi con soluzione fisiologica tamponata per realizzare la curva campione per la procedura quantitativa.

c) Reagente senza antisiero

Si tratta di un reagente con composizione uguale al reagente antisiero, ma con assenza di quest'ultimo, da utilizzarsi in procedura di controllo e calibrazione, come bianco campione.

La procedura operativa per condurre l'analisi secondo l'invenzione può essere riassunta nel modo seguente.

I reagenti antisiero e senza antisiero sono portati a temperatura ambiente, filtrando il volume del primo necessario all'analisi, qualora non limpido.

Il reagente senza antisiero è miscelato in provetta al calibratore, e il reagito deve risultare limpido.

Quindi il reagente antisiero è miscelato al calibratore, e il reagito deve risultare torbido .

Se le letture non sono quelle previste, ciò è dovuto a errore di procedura o ad anomalia dei reagenti che quindi devono essere scartati.

Dopo centrifugazione del campione, si procede quindi al trattamento di esso con reagente antisiero: la torbidità è segno di presenza di catene leggere kappa o lambda, o entrambe.

Non sono qui precisate nel dettaglio le procedure di

esecuzione della reazione antisiero-campione, essendo quelle usuali per effettuare reazioni antigene-anticorpo. E' evidente che si opererà in eccesso di quest'ultimo, e per campioni dubbi o negativi si potrà aggiungere nella provetta di reazione una quantità supplementare di urina, e valutare se tale aggiunta modifica la torbidità in modo apprezzabile.

Per la lettura quantitativa strumentale è necessario costruire la curva di calibrazione ripetendo la procedura di analisi con reagente antisiero su campioni ottenuti da soluzioni, a diverse percentuali, di calibratore in soluzione salina tamponata. Ad esempio possono essere eseguite determinazioni del valore di torbidità su soluzioni di calibratore al 20, 40, 60, 80, 100%. E'così possibile riportare in diagramma cartesiano le concentrazioni di catene leggere libere delle soluzioni di calibratore in funzione della densità ottica al netto del bianco campione, misurata con adeguato apparecchio, come Fotometro Biotron Mod. 336, o Analizzatore Cobas Bio (Roche). Come si è sopra precisato, è nota la concentrazione di catene leggere libere nel calibratore presentato come liofilizzato da ricostituire per diluizione in quantità predeterminata di acqua distillata.

Una alternativa alla procedura sopra indicata è possibile utilizzando non un solo reagente antisiero anti catene leggere libere kappa e lambda, ma due separati reagenti anti catene leggere libere rispettivamente kappa e lambda. Si ottengono in

questo modo separati risultati di concentrazione dei due tipi di catene, qualora ciò sia desiderato per particolari esigenze diagnostiche o sperimentali. per il resto nulla muta nella procedura sopra ricordata. in questo caso è opportuno predisporre rispettivi calibratori kappa e lambda per le verifiche precedenti la procedura di analisi del campione e per la costruzione delle curve di calibrazione per l'analisi quantitativa.

I risultati dell'analisi sono stati verificati mediante esecuzione di tradizionale esame elettroforetico sui campioni analizzati secondo l'invenzione, ottenendo conferma della esattezza dei risultati con quest'ultima ottenuti. Sono peraltro risultati positivi campioni risultati negativi da esami elettroforetici tradizionali, con concentrazione dei campioni da 10 a 50 volte, a seconda dell'abitudine dei diversi laboratori.

La singolare e sorprendente efficacia del metodo è dimostrata dal fatto che è risultata apprezzata con esso una concentrazione di catene leggere anche di circa 4 mg/dl, dimostrando che la applicazione in questo specifico campo della tecnica della reazione antigena-anticorpo ha portato ad un risultato soddisfacente per il problema dell'individuazione della presenza di catene leggere libere in urina.

Praticamente, l'unico limite del metodo è la sua impossibilità a distinguere fra catene leggere monoclonali e policlonali,

ciò che invece è ottenibile con analisi elettroforetica, con immunofissazione.

Tuttavia, la positività dell'analisi per una sola delle due catene leggere, kappa o lambda, può essere ritenuto segno ragionevolmente certo di monoclonalità delle catene presenti nel campione.

Questa limitazione tuttavia è largamente compensata dalla rapidità, affidabilità e semplicità dell'esecuzione del metodo secondo l'invenzione rispetto a quello precedentemente utilizzato a questo fine. Solo sui campioni risultati positivi all'analisi secondo l'invenzione sarà richiesto di eseguire ulteriori analisi immunoelettroforetiche o con immunofissazione, per determinare, se desiderato, la natura delle catene leggere libere.

A questo proposito si deve notare che, in questo tipo di analisi diagnostica, la positività è statisticamente da considerarsi, se non rara, certo molto poco frequente. Risulta quindi estremamente utile poter disporre del metodo secondo l'invenzione, che permette un primo screening dei campioni, con altissima sensibilità e attendibilità del risultato, perchè poi possano essere approfonditi gli esami sul limitato numero dei campioni risultati positivi all'analisi.

RIVENDICAZIONI

1) Metodo per la determinazione della presenza di catene leggere libere in campioni non diluiti di urina comprendente

le fasi di:

- centrifugare il campione di urina e separare il sovranatante per l'esecuzione della determinazione;
- aggiungere al campione un reagente antisiero anti catene leggere operando in eccesso di anticorpo;
- valutare la torbidità del campione reagito.

2) Metodo secondo la rivendicazione 2, in cui il campione è fatto reagire successivamente con antisieri rispettivamente anti catene leggere libere di tipo kappa e di tipo lambda.

3) Metodo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che la torbidità del campione reagito è valutata per confronto con il prodotto della reazione del reagente antisiero con un calibratore a contenuto predeterminato di catene leggere libere.

4) Metodo secondo la rivendicazione 3, caratterizzato dal fatto che per il confronto è costruita una curva di calibrazione valutando strumentalmente il valore di torbidità del prodotto di reazione del reagente antisiero con campioni costituiti da soluzioni del calibratore a diverse concentrazioni.

5) Metodo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che il reagente è ottenuto per immunizzazione di animale con catene leggere libere.

6) Metodo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che il calibratore è ottenuto da urina di pazienti con

mieloma micromolecolare.

7) Complesso di prodotti in forma di kit, per eseguire la determinazione della presenza di catene leggere libere in campioni non concentrati di urina, comprendente:

un reagente antisiero anti catene leggere libere;

un reagente senza antisiero con composizione sostanzialmente uguale a quella del reagente antisiero;

un calibratore costituito da sostanza contenente catene libere leggere in concentrazione predeterminata.

8) Complesso di prodotti secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto che detto reagente antisiero contiene anticorpi anti catene libere leggere di tipo kappa e lambda.

9) Complesso di prodotti secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto che detto reagente antisiero è contenuto nel complesso di prodotti come quantità separate di antisiero anti catene leggere kappa e antisiero anti catene leggere lambda.

10) Complesso di prodotti secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto che detto calibratore è costituito da liofilizzato da urine di paziente affetto di mieloma micromolecolare, da ricostituire prima dell'uso con acqua distillata.

11) Reagente destinato alla analisi di presenza di catene leggere libere per aggiunta a un campione di urina umana, attraverso valutazione della torbidità del prodotto di

Ingg. GUZZI e RAVIZZA

reazione, caratterizzato dal comprendere antisiero anti catene
leggere.

I mandatori
V. FARAGGIANA - F. MARTEGANI
C. SEGRE JARACH
[Signature]
(per se e per gli altri)

