



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

UIBM

DOMANDA NUMERO	101994900377589
Data Deposito	01/07/1994
Data Pubblicazione	01/01/1996

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	K		

Titolo

MATERIALE PROTEICO RICOMBINANTE LEGANTE ANTICORPI CONTRO IL
CITOMEGALOVIRUS UMANO, REAGENTI DIAGNOSTICI DERIVATI DA TALE MATERIALE
PROTEICO E PLASMIDE RICOMBINANTE ESPRIMENTE LO STESSO.

DESCRIZIONE

TO 94A000543

di Brevetto per Invenzione Industriale

di 1) LANDINI Maria Paola e 2) RIPALTI Alessandro

entrambi di nazionalità Italiana, rispettivamente domiciliati

a 1) 40127 BOLOGNA - via S.Apollonia, 2 e

a 2) 40127 BOLOGNA - via Petrarca, 25

*** * ***

Inventori: **RIPALTI Alessandro, LANDINI Maria Paola**

*** * ***

La presente invenzione è relativa ad un materiale proteico capace di legarsi per reazione immunitaria con anticorpi contro il Citomegalovirus umano; in particolare, l'invenzione è relativa ad un peptide ricombinante prodotto come proteina di fusione e incorporante epitopi della proteina DNA-legante non strutturale di 52 kD (p52) del Citomegalovirus umano, qui e di seguito indicato per brevità come HCMV, e epitopi della fosfoproteina strutturale da 150 kD (pp150) del HCMV, contro le quali sono prodotte nell'organismo umano sia IgG che IgM specifiche. L'invenzione è inoltre relativa a reagenti diagnostici derivati da tale materiale proteico e ad un plasmide esprime lo stesso.

La infezione da Citomegalovirus umano (HCMV) è la causa più comune di infezione congenita nell'uomo. Per esempio, le infezioni intrauterine primarie sono seconde solamente alla sindrome di DOWN come causa di ritardo mentale; le infezioni secondarie sono anche origine di gravi complicanze, sebbene meno severe. Poiché le madri di neonati infetti raramente mostrano segni della infezione durante la gravidanza, le tecniche di laboratorio sono l'unico mezzo per accertare infezioni acute da HCMV in tali soggetti.

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

La diagnosi di infezioni da HCMV può essere ottenuta per dimostrazione diretta della presenza del virus o di sue componenti nel materiale patologico, oppure indirettamente attraverso le tecniche sierologiche (Landini M.P. 1993. New approaches and perspectives in cytomegalovirus diagnosis. Progress in Medical Virology 40:157-177). La diagnosi della infezione primaria è esclusivamente ottenuta mediante metodi sierologici, cioè mediante dimostrazione della presenza di anticorpi verso il HCMV in soggetti che erano sieronegativi; in particolare, è indicazione sensibile e specifica di infezione primaria la comparsa di IgM CMV-specifiche. Infatti, IgM sono rilevate nel 55-75% dei sieri di donne in gravidanza soggette ad infezione primaria e nel 70% approssimativamente dei sieri di neonati con infezione congenita. Però, il livello di affidabilità della diagnosi sierologica varia grandemente in funzione della composizione dell'antigene utilizzato, a causa della mancanza di standardizzazione nella scelta degli antigeni.

I materiali antigenici composti da singole proteine virali ben caratterizzate o da porzioni di esse, prodotti con tecniche di biologia molecolare o di chimica peptidica si sono dimostrati strumenti molto promettenti per migliorare la diagnosi sierologica [Jahn G.G. et al. 1987. The two major phosphoproteins (pp65 and pp150) of human cytomegalovirus and their antigenic properties. J. Gen. Virol. 68:1327-1337; Landini M.P. et al. 1990. Large scale screening of human sera with cytomegalovirus recombinant antigens. J.Clin.Microbiol. 28:1375-1379; Scholl B.C. et al. 1988. Procaryotic expression of immunogenic polypeptides of the large phosphoprotein (pp150) of human cytomegalovirus. J. Gen. Virol. 69:1195-1204].

In particolare, l'analisi della risposta immunitaria umorale che emerge durante la infezione naturale ha ripetutamente dimostrato che la fosfoproteina di 150kD codificata dal gene UL32 e localizzata al tegumento virale (ppUL32) è altamente

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

immunogena ed è riconosciuta dai sieri provenienti da quasi il 100% dei soggetti HCMV-sieropositivi testati, essendo prodotte contro di essa sia IgG (di tutte le sottoclassi), sia IgM ed IgA (Landini M.P. et al. 1985. Human immune response to Cytomegalovirus structural polypeptides studied by immunoblotting. *J. Med. Virol.* 17: 303-311). In questa molecola, sono stati identificati almeno due epitopi diversi che si sono dimostrati in grado di reagire efficacemente con immunoglobuline umane: una prima regione costituita dagli ultimi 25 amminoacidi (aa 1024-1048) dell'estremità carbossil-terminale della molecola (Landini M.P. et al. 1991. Human Cytomegalovirus structural proteins: immune reaction against pp150 synthetic peptides. *J. Clin. Microbiol.* 29:1868-1872), capace di reagire con circa l'80% dei sieri positivi per IgM; ed una seconda regione costituita dalla sequenza di amminoacidi, presa in direzione 5'-->3', da 595 a 614 della molecola, capace di dare una reazione positiva con quasi il 100% di sieri positivi per IgG (Novak J.P. et al. 1991. Mapping of serologically relevant regions of human cytomegalovirus phosphoprotein pp150 using synthetic peptides. *J. Gen. Virol.* 72:1409-1413). Nel tentativo di migliorare la antigenicità di questi due epitopi relativamente brevi di ppUL32 le sequenze di DNA codificanti per tali epitopi sono state clonate in un vettore di espressione procariotico esprimendo una proteina di fusione portante i due epitopi fusi insieme in un singolo polipeptide, che può essere espresso in un largo numero di cellule batteriche (Ripalti A. et al. 1994. Construction of a polyepitope fusion antigen of human cytomegalovirus ppUL32; reactivity with human antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 32:358-363).

Ulteriori studi (Landini M.P. et al. 1990. *J.Clin.Microbiol.* 28:1375-1379) hanno messo in luce che un'altra proteina virale altamente immunogena è la proteina non strutturale da 52 kD, codificata dal gene UL44, parte della quale può essere

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

prodotta come proteina di fusione in Lac- E.coli Y1089 infettando una coltura di questo batterio con un batteriofago ricombinante G2 (Ripalti A. et al. 1989. Identification and preliminary use of recombinant lambda gt11 fusion proteins in Cytomegalovirus diagnosis. J. Gen. Virol. 70:1247-1251) individuato in una genoteca espressiva del fago LambdaGT11 (Mocarski E. et al. 1985. Proc. Nat. Academy of Sciences. 82:1266-1270) e inducendo la produzione della proteina di fusione con isopropil- β -D-tiogalattopiranoside (IPTG). La proteina di fusione, denominata G2, è costituita da uno o più epitopi localizzati nella regione carbossil-terminale della p52 espressa insieme con β -galattosidasi e si è dimostrata utilizzabile con successo nella diagnosi della infezione primaria da HCMV, in quanto altamente reattiva alle IgM. La sequenza di DNA esprimente tale regione è stata inserita nel plasmide p-ROS (che reca una sequenza troncata di LacZ) nel sito SmaI e clonata in E.coli ottenendo una proteina di fusione denominata H10 che ha dato buoni risultati. (Ripalti A. et al. 1994. Prokariotic expression of a large fragment of the most antigenic cytomegalovirus DNA-binding protein (ppUL44) and its reactivity with human antibodies. J. Virol. Methods 46:39-50).

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 356)

Tutti gli studi sopra riportati, tuttavia, non hanno ancora permesso di trovare proteine di fusione veramente capaci di sostituire il virus o le sue parti (virioni purificati) nei kit diagnostici di uso corrente.

Scopo della presente invenzione è quello di fornire un materiale proteico ricombinante, in particolare una proteina di fusione, capace di legare per reazione immunitaria anticorpi prodotti contro il Citomegalovirus umano, in particolare sia IgM che IgG, che possa essere impiegato come antigene per la cattura di tali anticorpi nei relativi test sierologici con efficacia sostanzialmente pari a quella del virus e/o di lisati di cellule infette.

A handwritten signature is written over a circular stamp. The stamp contains the text "19/11/90" and some other illegible markings.

E' anche uno scopo dell'invenzione quello di realizzare reagenti diagnostici derivati da tale materiale proteico.

E' infine uno scopo dell'invenzione quello di fornire un plasmide inseribile in un organismo ospite procariotico e/o eucariotico per esprimere detto materiale proteico ricombinante come una proteina di fusione.

In base all'invenzione viene fornito un materiale proteico ricombinante atto a legare anticorpi contro il Citomegalovirus umano (HCMV), caratterizzato dal fatto che consiste in una proteina di fusione comprendente una prima regione costituita da almeno parte della sequenza carbossil-terminale degli ultimi 233 amminoacidi della proteina p52, una seconda regione costituita da almeno parte della sequenza carbossil-terminale degli ultimi 44 amminoacidi della proteina pp150, ed una terza regione costituita da almeno parte della sequenza, presa procedendo in direzione 5'-->3', di amminoacidi da 595 a 614 della proteina pp150; dette regioni essendo tra loro comunque disposte nella proteina di fusione.

Preferibilmente, le dette regioni includono per intero le dette sequenze di amminoacidi della p52 e della pp150 e, secondo una preferita ma non limitativa forma di attuazione, la proteina di fusione dell'invenzione comprende in sequenza, procedendo in direzione 5'-->3': la detta prima regione, immediatamente a valle della quale è disposta la detta terza regione, e poi la detta seconda regione, che è disposta a valle della detta terza regione, tra le dette terza e seconda regione essendo inserita una sequenza ponte.

Tale sequenza ponte è costituita, procedendo in direzione 5'-->3' dalla seguente serie di amminoacidi: lys leu gln glu phe.

L'invenzione fornisce inoltre un reagente diagnostico per la determinazione sierologica di uno stato di infezione da HCMV, caratterizzato dal fatto di

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

comprendere una proteina di fusione come sopra definita.

In particolare, il reagente diagnostico comprende una proteina di fusione almeno una parte degli amminoacidi della quale è codificata dalla sequenza di nucleotidi indicata nella lista di sequenze come SEQ ID NO: 1, letta a partire dal nucleotide 001 e fino al nucleotide 900.

Fanno anche parte dell'invenzione reagenti diagnostici per la ricerca sierologica diretta di HCMV comprendenti almeno un siero policlonale monospecifico oppure anticorpi monoclonali (MaB) diretti contro la detta proteina di fusione.

L'invenzione è infine relativa ad un plasmide inseribile in un organismo ospite procariota od eucariota, caratterizzato dal fatto di comprendere, in combinazione, una prima sequenza di DNA codificante per almeno parte degli ultimi 233 amminoacidi carbossil-terminali della proteina p52 del HCMV, una seconda sequenza di DNA codificante per almeno parte degli ultimi 44 amminoacidi della sequenza carbossil-terminale della proteina pp150, ed una terza sequenza di DNA codificante per la sequenza di amminoacidi compresa, procedendo in direzione 5'-3', tra l'amminoacido 595 e l'amminoacido 614 inclusi della proteina pp150.

In particolare, il plasmide include la sequenza di nucleotidi indicata nella lista di sequenze come SEQ ID NO: 1, a partire dal nucleotide 002 e fino al nucleotide 907.

Per una migliore comprensione dell'invenzione verrà ora data una descrizione non limitativa di alcuni suoi esempi di attuazione, con riferimento alle figure dei disegni annessi, nelle quali:

- la figura 1 illustra in forma schematica la posizione dei frammenti di DNA codificanti per due delle parti caratterizzanti la proteina di fusione dell'invenzione, nel gene UL32 contenuto nel frammento EcoRI-Y del virus ceppo AD169;

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

- le figure da 2 a 5 illustrano in forma schematica i metodi di preparazione di plasmidi utilizzati nel perfezionamento dell'invenzione; e
- le figure 6 e 7 riportano due tabelle comparative di dati sperimentali di riconoscimento di IgG e IgM provenienti da individui infetti da HCMV effettuato con test ELISA utilizzando l'intero virus oppure diverse proteine ricombinanti di fusione inclusa quella dell'invenzione.

Dal brevetto europeo nr. 262531 sono note parti immunogene della fosfo-proteina strutturale di HCMV da 150 kD che dovrebbero essere codificate dal gene che si trova nel frammento Hind III-Y/N del genoma virale; sempre secondo tale brevetto europeo, tali parti immunogene della proteina pp150 dovrebbero essere codificate in particolare da un frammento da circa 1,5 kilobasi EcoRI-PstI, che si trova all'interno della regione del frammento EcoRI-Y derivante dal genoma di HCMV ceppo AD169.

Studi successivi, più approfonditi, hanno permesso di accertare che tali deduzioni erano erranee, in quanto (figura 1) la proteina pp150 risulta codificata dal gene UL32 che è molto più lungo di 1,5 kilobasi e che si trova comunque abbondantemente fuori a qualsiasi frammento EcoRI-PstI che può essere definito all'interno del frammento EcoRI-Y di AD169. Inoltre, il frammento EcoRI-Y si trova completamente al di fuori (in particolare a fianco, spostato verso l'estremità -NH₂ terminale) del frammento Hind III-Y/N. I Richiedenti, ritengono pertanto che le proprietà immunogene evidenziate dal materiale proteico richiamato nel brevetto citato (che, però, identifica il polipeptide non correttamente e, quindi, lasciandolo sostanzialmente indeterminato) fossero correlate all'inclusione nel peptide dell'epitopo chiamato A1C2 codificato dai nucleotidi di UL32 che vanno, procedendo in direzione 5'-->3', dal nucleotide 1783 al nucleotide 1842, cioè

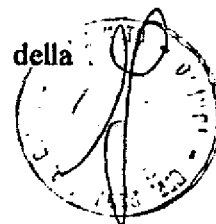
PLEBANI Rinaldo
(Iscrizione Albo nr. 358)

all'inclusione della regione corrispondente alla sequenza di amminoacidi da 595 a 614 di ppUL32 identificata posteriormente (Novak J.P. et al. 1991. Mapping of serologically relevant regions of human cytomegalovirus phosphoprotein pp150 using synthetic peptides. J. Gen. Virol. 72:1409-1413)

Sulla base di quanto sopra, di quanto esposto nel proprio studio sulle proteine di fusione poliepitopiche pubblicato sul J. Clin. Microbiol. 32:358-363 (Ripalti A. et al. 1994. op.cit.), il cui contenuto è qui incorporato per le parti necessarie per semplice riferimento, e sulla base di studi successivi, che hanno permesso di dimostrare come l'immunogenicità dell'altra regione della ppUL32 già nota come altamente immunogena, costituita dagli ultimi 25 amminoacidi dell'estremità carbossil-terminale della molecola (Landini M.P. et al. 1991. op.cit.), potesse essere ulteriormente migliorata dall'aggiunta di altri 19 amminoacidi (Ripalti A. non ancora pubblicato), i Richiedenti, operando con il plasmide p-ROS secondo le note tecniche di Maniatis et al. (1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.) hanno preparato una serie di cloni che, inseriti in E.coli ed attivati con IPTG, sono atti a produrre tutta una serie di proteine di fusione includenti una porzione di β -galattosidasi (β -Gal), che sono poi state cimentate comparativamente con tecniche note (Western blott, Immunoblott, ELISA, eccetera) con sieri IgM ed IgG positivi per HCMV provenienti da pazienti trapiantati allo scopo di verificarne i diversi gradi di riconoscimento.

In particolare, sono stati preparati un primo plasmide denominato pMB28 adatto ad esprimere la sequenza di amminoacidi A1C2; un secondo plasmide denominato pGT1 adatto ad esprimere una nuova sequenza immunogena della ppUL32 costituita dagli ultimi 44 amminoacidi della estremità carbossil-terminale della

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)



proteina virale pp150, denominata F3 e codificata dai nucleotidi di UL32 che vanno, procedendo in direzione 5'-->3', dal nucleotide 3013 al nucleotide 3144; ed un terzo plasmide denominato pMB34 capace di esprimere insieme le sequenze di A1C2 e di F3 come un'unica proteina di fusione con β -Gal; il primo plasmide è stato ottenuto inserendo un frammento di DNA modificato ed amplificato per PCR tra i siti SalI e HindIII della regione di policlonazione del vettore di espressione procariotica p-ROS operando secondo **Platchter et al.** (1992. "Detection of cytomegalovirus..."; J. Clin. Microbiol. 30:201-206); il secondo, invece, è stato ottenuto inserendo nel sito SmaI di p-ROS un frammento EcoRI di DNA estratto da un clone lambdaGT11 e opportunamente alterato per mutagenesi mediante vettore p-Alter in modo da sostituire un codone di STOP con un corrispondente sito EcoRI. Il terzo plasmide è stato ottenuto a partire dal plasmide pMB28, inserendo in esso il medesimo frammento EcoRI di 78 bp (base pairs) codificante per F3 utilizzato per pGT1 nel sito StuI, lasciando così tra le due sequenze di DNA codificanti per A1C2 e per F3 una sequenza ponte di cinque amminoacidi: lys leu gln glu phe (K, Q, L, E ed F secondo la codifica IUPAC).

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

Secondo l'intuizione alla base dell'invenzione, è stata inoltre inserita nel raffronto comparativo anche la valutazione dell'epitopo noto altamente immunogeno della proteina virale p52 costituito dagli ultimi 233 amminoacidi della estremità carbossil-terminale della stessa (denominato H10).

A questo scopo, la sequenza di nucleotidi H10 contenuta nel genoma del fago LambdaGT11 tra due siti ravvicinati di restrizione EcoRI disposti immediatamente a monte del gene lacZ viene ottenuta, operando secondo le ben note tecniche di Berg e Kaiser, per digestione con EcoRI; successivamente, le estremità (terminanti a gradino) vengono rese terminanti a filo (blunt) mediante una operazione di

riempimento (filling in) in presenza di DNA-polimerasi, in cui le ~~basi~~adenina/timina (A/T) spaiate vengono complementate con i nucleotidi ~~corrispondenti~~. Nel contempo, il plasmide p-ROS viene digerito con SmaI, che ne ~~determina~~ l'apertura e la linearizzazione; poi il frammento EcoRI H10 di LambdaGT11 e il ~~p~~plasmide aperto vengono incubati insieme in presenza di DNA-ligasi, ottenendo l'inserzione del frammento H10 nel sito apposito SmaI previsto in p-ROS e la conseguente formazione di un plasmide pGH10. Questo è a sua volta ~~inserito~~ in E.coli per elettroporazione e clonato.

Infine, a partire dai plasmidi precedenti, viene preparato ~~un~~ ultimo plasmide "misto", includente sia le sequenze di DNA codificanti per A1C22 e per F3, che quella codificante per H10. A tale scopo, sono sintetizzati una coppia di oligonucleotidi per pGH10 ed una coppia di oligonucleotidi per ~~pp~~MB34, le cui sequenze consentono di utilizzarli per l'amplificazione a ~~catena~~ mediata della polimerasi termostabile (PCR) della sequenza di H10 e della ~~sequenza~~ di A1C2-F3 rispettivamente; poi, tali coppie di oligonucleotidi, che contengono ~~le~~ delle sequenze atte a introdurre opportuni siti di riconoscimento per prefissati ~~enzimi~~ di restrizione (nella fattispecie EcoRI) alle estremità 5' e sequenze in comune tra l'estremo 5' e quello 3' di H10 e A1C2-F3 rispettivamente all'estremo opposto, ~~sono~~ utilizzate per ottenere l'amplificazione di un unico frammento di DNA ~~contenente~~ tutti e tre gli epitopi considerati, già nell'ordine di espressione desiderato e ~~pronto~~ ad essere clonato nei siti scelti del vettore di espressione, nella fattispecie ~~nel~~ sito SmaI di pROS per l'espressione degli epitopi sotto forma di proteina di ~~fusione~~ con β -Gal; in definitiva, il plasmide derivante, denominato pMB40 risulta ~~per~~ tanto ~~comprendere~~ in corrispondenza del sito SmaI la sequenza di DNA SEQ ID NO: 11, a partire dal nucleotide 002 e fino al nucleotide 907, codificante per una ~~nuova~~ proteina di

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

fusione includente, simultaneamente, sia l'epitopo noto più immunogeno per IgG di pp150 (A1C2), sia l'epitopo noto più immunogeno di p52 (H10), sia il nuovo epitopo immunogeno di pp150 (F3) derivante dall'aggiunta di altri 19 amminoacidi all'epitopo noto di pp150 costituito dagli ultimi 25 amminoacidi (sequenza denominata D1) della estremità carbossil-terminale della stessa.

Sorprendentemente, questa nuova proteina di fusione, denominata H10/A1C2/F3, ha dimostrato una reattività sia verso IgG che IgM molto superiore a quella ottenibile dosando opportunamente le proteine contenenti i tre epitopi separati in un unico kit di ricerca. Vi è pertanto un effetto sinergico, che deve probabilmente essere ricercato nel fatto che, disponendo strettamente vicini tra loro epitopi che si trovano normalmente molto distanti sulla stessa proteina virale (l'A1C2 e l'F3 di ppUL32 per esempio) o addirittura su proteine diverse (come H10 di pUL44) si vengono a "mimare" epitopi conformazionali probabilmente presenti nelle proteine virali originarie complete e/o sui virioni.

La nuova proteina di fusione includente le sequenze suddette si è dimostrata infatti altrettanto attiva dei virioni purificati nel legarsi con le IgG e IgM di soggetti infetti, offrendo finalmente, per la prima volta, la disponibilità di un antigene quantitativamente e qualitativamente standardizzato, capace di sostituire realmente i virioni purificati e/o le cellule infettate nella preparazione di kit diagnostici per le analisi sierologiche di infezione da HCMV. E' ovvio che la nuova proteina di fusione secondo l'invenzione può includere i suddetti epitopi nell'ordine presente nella sequenza SEQ ID NO: 2, che è quella attualmente preferita, oppure in una qualsiasi altra sequenza diversa, con inserite o meno delle sequenze ponte tra loro, come quella espressa dalla sequenza di nucleosidi da 757 a 771 della SEQ ID NO: 1.

Il plasmide pMB40 che esprime tale proteina può essere inserito in un organismo

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

ospite procariotico, come E.coli. Inoltre, il particolare metodo di ottenimento descritto per il frammento "misto", permette anche la sua clonazione in un vettore diverso, in particolare, dopo digestione con EcoRI, nel sito corrispondente del vettore pHIL-S1, ottenendo così il plasmide pHIL-D1, che consente l'espressione della proteina ricombinante nel lievito Pichia pastoris, fusa ad un breve peptide che costituisce un segnale di secrezione al di fuori della cellula del lievito, nel mezzo di coltura. Quest'ultima modalità di espressione consente tra l'altro di indurre la produzione della proteina di fusione con metanolo, e non con IPTG, come per l'espressione in E.coli, risultando perciò enormemente meno costosa. Conseguentemente, si è anche in grado di produrre la proteina di fusione secondo l'invenzione in modo massiccio, semplice e poco costoso.

La proteina di fusione secondo l'invenzione è utilizzabile per preparare direttamente reagenti diagnostici per la determinazione sierologica della presenza di anticorpi verso il HCMV, in quanto presenta la capacità di legare con una efficienza del sostanzialmente 100% sia le IgM che le IgG anti-HCMV e, in particolare, anche quelle che vengono prodotte durante una fase primaria asintomatica dell'infezione citomegalica. Tali reagenti diagnostici comprendono la proteina di fusione H10/A1C2/F3, da sola oppure, eventualmente, in associazione con altri antigeni HCMV (ad esempio le proteine codificate dai geni UL83 e UL84 o parti di esse), oppure una proteina di fusione più complessa, includente le suddette tre sequenze immunogene A1C2, F3 e H10, ripetute più volte e comunque combinate tra loro, da sole e/o in associazione con altre sequenze delle medesime proteine virali pp150 e p52 o di altre proteine virali.

Il materiale proteico costituito dalla proteina di fusione secondo l'invenzione è inoltre utilizzabile per preparare, con tecniche note, reagenti diagnostici per la

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)



ricerca sierologica diretta del Citomegalovirus umano e/o di antigeni dello stesso costituiti da sieri policlonali monospecifici contro la proteina di fusione H10/A1C2/F3 stessa, oppure da anticorpi monoclonali (MaB) diretti contro la proteina H10/A1C2/F3 e variamente ottenuti.

I reagenti diagnostici suddetti, contenenti la proteina secondo l'invenzione, possono a loro volta venire utilizzati per produrre un kit diagnostico per la determinazione sierologica della presenza di anticorpi verso il Citomegalovirus umano (HCMV), in cui il reagente è adsorbito su un supporto solido di nitrocellulosa (reazione di "blotting"). La proteina dell'invenzione può infine, previa purificazione, essere impiegata in saggi ELISA, agglutinazione al lattice, RIA e in tutte le altre reazioni sierologiche note per la ricerca di IgG e IgM specifiche, eseguite sia manualmente che in modo parzialmente o completamente automatizzato.

L'invenzione verrà ora ulteriormente descritta con riferimento ai seguenti esempi non limitativi di attuazione.

ESEMPIO 1

H10 in pROS:

Operando con le tecniche standard del DNA ricombinante, secondo Maniatis et al.(1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.) e a partire da plasmidi pROS forniti dagli autori degli stessi (Ellinger et al. op.cit.) si purifica il genoma di un clone ottenuto da una genoteca espressiva di Lambda Gt11, che produce una proteina di fusione con β -galattosidasi molto reattiva con sieri umani positivi per CMV. Il genoma viene poi digerito con l'enzima di restrizione EcoRI per estrarne il frammento di DNA espresso dal fago. Il frammento viene quindi clonato nel vettore pUC18 e sequenziato. La sequenza è risultata rappresentare un frammento di 699 paia di basi

esprimenti 233 aminoacidi dell'estremo carbossilico di p52 (UL44). Il frammento è stato infine clonato nel sito SmaI del vettore espressivo pROS, dopo "filling in" delle estremità EcoRI del frammento, secondo lo schema illustrato in figura 2. Il plasmide ottenuto è stato chiamato pROSH10.

ESEMPIO 2

A1C2:

Operando con le tecniche di cui all'esempio 1 ed utilizzando il metodo di sintesi peptidica in fase solida secondo Merrifield, sono stati prodotti due oligonucleotidi tali da servire da primer per l'amplificazione di un frammento genomico del HCMV, di 60 paia di basi, esprime un epitopo centrale della proteina pp150 (aa595-614). Tali oligonucleotidi sono stati sintetizzati con estremità recanti sequenze di riconoscimento per enzimi di restrizione: il primer in 5' recava la sequenza riconosciuta da SalI, mentre quello in 3' la sequenza riconosciuta da HindIII. Utilizzando DNA genomico virale purificato come "template" e i due primer appena descritti, è stato amplificato il frammento di DNA desiderato e, dopo digestione con SalI e HindIII, clonato nei corrispondenti siti del plasmide espressivo pROS come da schema in figura 3, ottenendo il plasmide pMB28.

ESEMPIO 3

F3:

Operando con le tecniche di cui all'esempio 1, è stato purificato il genoma di un clone, ottenuto da una genoteca espressiva di Lambda Gt11, che produce una proteina di fusione con β -galattosidasi molto reattiva con sieri umani positivi per CMV. Il genoma è stato digerito con l'enzima di restrizione EcoRI per estrarne il frammento di DNA espresso dal fago. Il frammento è stato quindi clonato nel vettore pUC18 e sequenziato. La sequenza è risultata rappresentare un frammento

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

di 132 paia di basi esprimenti 44 aminoacidi dell'estremo carbossilico di pp150 (UL32). Il frammento è stato infine clonato nel sito SmaI del vettore espressivo pROS, dopo "filling in" delle estremità EcoRI del frammento, operando secondo il medesimo schema dell'esempio 1. Il plasmide ottenuto è stato chiamato pGT1.

ESEMPIO 4

A1C2-F3:

Per l'espressione dei due epitopi di pp150, precedentemente espressi mediante i plasmidi pMB28 (A1C2) e pGT1 (F3), il frammento codificante per F3 è stato clonato nel sito StuI di pMB28 dopo "filling in" delle estremità EcoRI, generate dall'estrazione di F3 dal vettore pUC18, nel quale era stato clonato per il sequenziamento. Il nuovo plasmide risultante è stato chiamato pMB34 ed esprime i due epitopi separati da un ponte di cinque aminoacidi, come risulta dallo schema in figura 4.

ESEMPIO 5

H10-A1C2-F3:

A partire dai plasmidi precedentemente descritti, ed in base ai metodi dell'esempio 1 e 2, si opera secondo lo schema di figura 5, nel modo seguente: sono sintetizzate due coppie di oligonucleotidi, le cui sequenze consentono di utilizzarli per l'amplificazione a catena mediata dalla polimerasi termostabile (PCR) della sequenza di H10 e della sequenza di A1C2-F3, presenti nei plasmidi pGH10 e pMB34. Le sequenze di oligonucleotidi che costituiscono questi primer sono le seguenti:

^{Eco}H10: GAA TTC ACA GCC AAT AAC CGC GTC AGT TTC;

^{H10}_{A1C2}: AGG CGT CGG CGT GCC GCA CTT TTG CTT CTT GGT GTT

per amplificare H10 da pGH10, introdurre un sito EcoRI in 5' nella sequenza amplificata e una sequenza di 12 paia di basi omologa a A1C2 in 3' nel

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

frammento amplificato; e

H10^{A1C2}: CAA AAG TGC GGC ACG CCG ACG CCT GTC AAT CCT TCC;

F3_{Eco}: GAA TTC CTA TTC CTC CGT GTT CTT AAT CTT

per amplificare il frammento A1C2-F3 dal plasmide pMB34 introducendo una sequenza omologa ad H10 in 5' nell'amplificato e un sito EcoRI in 3'.

I due frammenti risultanti dalle due amplificazioni indipendenti (Eco^{H10}A1C2 e

H10^{A1C2-F3}Eco) vengono in seguito mescolati, insieme ai primer esterni

Eco^{H10} e F3_{Eco}, e quindi sottoposti a nuova amplificazione. Grazie alla complementarietà dell'estremo 3' di Eco^{H10}A1C2 e dell'estremo 5' di

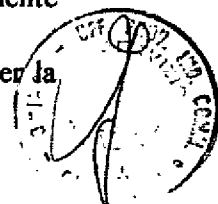
H10^{A1C2-F3}Eco, ne risulta un amplificato che riunisce tutti e tre gli epitopi e risulta avere un sito EcoRI ad ogni estremità di questo.

La sequenza amplificata è infine clonata in pROS, e il plasmide risultante, chiamato pMB40, risulta includere, in corrispondenza del sito SmaI, la sequenza di DNA SEQ ID NO: 1, a partire dal nucleotide 002 e fino al nucleotide 907.

ESEMPIO 6

I plasmidi degli esempi da 1 a 5 vengono inseriti in E.coli per elettroporazione e clonati; viene poi indotta la produzione delle proteine di fusione desiderate con IPTG e le proteine prodotte vengono rese disponibili lisando i batteri e denaturando il lisato batterico in presenza di SDS e β-mercaptoetanololo; le proteine sono poi separate per SDS-PAGE in 9-12% acrilamide gel ed elettrotrasferite su nitrocellulosa, dove le immuno-reazioni sono sviluppate; si fa uso di una camera Miniblotter (Immunetics, Cambridge-Mass. USA) per screening preliminare di alcuni campioni di siero; IgG purificate (Endobulin, della ImmunoAG, Vienna AT) sono utilizzate a diluizione 1:100, così come anche un gruppo di sieri altamente positivi per IgM. I campioni di siero umano individuali sono diluiti 1:80 sia per la

PLEBANI Rinaldo
(iscrittione Albo nr. 358)



ricerca di IgG che di IgM; come secondo anticorpo si utilizza un coniugato perossidato anti- γ o anti- μ .

I sieri umani usati appartengono a due gruppi: il primo consiste di 17 sieri positivi per IgG CMV-specifiche, aventi alti (per 8) o medio/bassi (per 7) titoli ELISA; tali titoli vengono anche tutti confermati per "immunoblotting". Il secondo gruppo consiste di 19 sieri positivi per IgM CMV-specifiche, aventi alti (per 10) o medio/bassi (per 9) titoli ELISA, anche in questo caso tutti confermati per "immunoblotting".

La valutazione del titolo di IgG anti-HCMV è effettuata con un test kit CVM della M.A.Bioproducts (Walkersville, Md. USA); le piastre vengono lette su un lettore automatico Micro-ELISA (Dynatech Products, Alexandria, Va. USA). Per standardizzare il test ed eseguire l'analisi statistica per regressione lineare, ciascuna piastra include tre calibratori di siero. Per la valutazione del titolo di IgM anti-HCMV viene invece usato il test kit CMV IgM ELA della Technogenetics (Amburgo, Germania). I risultati vengono interpretati come suggerito dai produttori dei tests.

Tutti i campioni vengono anche sottoposti per sicurezza (onde escludere i risultati falso-positivi) a test per la ricerca del fattore reumatoide per agglutinazione al lattice (Rheuma-Wellco test della Wellcome, a Dartford, Gran Bretagna) e solo i campioni negativi sono utilizzati per le comparazioni.

I risultati sono riportati nelle Tabelle 1 e 2 di figure 6 (IgG) e 7 (IgM).

Come è possibile rilevare, non solo i risultati ottenuti con H10/A1C2/F sono nettamente migliori che quelli ottenuti con tutte le altre proteine di fusione esaminate, sia verso IgG che IgM, ma sono addirittura del tutto paragonabili ai risultati ottenuti con antigeni costituiti dal virus intero.

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

LISTATO DELLE SEQUENZE

(1) SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 908 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: NO

(ix) FEATURE:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION: 1..900

SEQ ID NO: 1:

GAA TTC ACA GCC AAT AAC CGC GTC AGT TTC CAC GGC GTA AAA AAC ATG	48
Glu Phe Thr Ala Asn Asn Arg Val Ser Phe His Gly Val Lys Asn Met	
1 5 10 15	
CGT ATC AAC GTG CAG CTG AAG AAC TTC TAC CAG ACG CTG CTC AAT TGC	96
Arg Ile Asn Val Gln Leu Lys Asn Phe Tyr Gln Thr Leu Leu Asn Cys	
20 25 30	
GCC GTC ACC AAA CTA CCG TGC ACG CTG CGT ATA GTT ACG GAG CAC GAC	144
Ala Val Thr Lys Leu Pro Cys Thr Leu Arg Ile Val Thr Glu His Asp	
35 40 45	
ACG CTG TTG TAC GTG GCC AGC CGC AAC GGT CTG TTC GCC GTG GAG AAC	192
Thr Leu Leu Tyr Val Ala Ser Arg Asn Gly Leu Phe Ala Val Glu Asn	
50 55 60	
TTT CTC ACC GAG GAA CCT TTC CAG CGT GGC GAT CCC TTC GAC AAA AAT	240
Phe Leu Thr Glu Glu Pro Phe Gln Arg Gly Asp Pro Phe Asp Lys Asn	
65 70 75 80	
TAC GTC GGG AAC AGC GGC AAG TCG CGT GGC GGC GGC GGT GGT GGC GGC	288
Tyr Val Gly Asn Ser Gly Lys Ser Arg Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly	
85 90 95	
AGC CTC TCT TCG CTG GCC AAT GCC GGC GGT CTG CAC GAC GAC GGC CCG	336
Ser Leu Ser Ser Leu Ala Asn Ala Gly Gly Leu His Asp Asp Gly Pro	
100 105 110	
GGT CTG GAT AAC GAT CTC ATG AAC GAG CCC ATG GGT CTC GGC GGT CTG	384
Gly Leu Asp Asn Asp Leu Met Asn Glu Pro Met Gly Leu Gly Gly Leu	
115 120 125	
GGA GGA GGT GGC GGC GGT GGC GGC AAG AAG CAC GAC CGC GGT GGC GGC	432
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Lys Lys His Asp Arg Gly Gly Gly	
130 135 140	

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

(2) SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 300 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein

SEQ ID NO: 2:

Glu	Phe	Thr	Ala	Asn	Asn	Arg	Val	Ser	Phe	His	Gly	Val	Lys	Asn	Met	
1				5				10						15		
Arg	Ile	Asn	Val	Gln	Leu	Lys	Asn	Phe	Tyr	Gln	Thr	Leu	Leu	Asn	Cys	
			20					25						30		
Ala	Val	Thr	Lys	Leu	Pro	Cys	Thr	Leu	Arg	Ile	Val	Thr	Glu	His	Asp	
			35					40					45			
Thr	Leu	Leu	Tyr	Val	Ala	Ser	Arg	Asn	Gly	Leu	Phe	Ala	Val	Glu	Asn	
	50						55				60					
Phe	Leu	Thr	Glu	Glu	Pro	Phe	Gln	Arg	Gly	Asp	Pro	Phe	Asp	Lys	Asn	
	65					70				75					80	
Tyr	Val	Gly	Asn	Ser	Gly	Lys	Ser	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	
			85						90					95		
Ser	Leu	Ser	Ser	Leu	Ala	Asn	Ala	Gly	Gly	Leu	His	Asp	Asp	Gly	Pro	
			100					105						110		
Gly	Leu	Asp	Asn	Asp	Leu	Met	Asn	Glu	Pro	Met	Gly	Leu	Gly	Gly	Leu	
		115					120					125				
Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Lys	Lys	His	Asp	Arg	Gly	Gly	Gly	
	130						135					140				
Gly	Gly	Ser	Gly	Thr	Arg	Lys	Met	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Asp	
	145				150					155					160	
His	Asp	His	Gly	Leu	Ser	Ser	Lys	Glu	Lys	Tyr	Glu	Gln	His	Lys	Ile	
			165						170					175		
Thr	Ser	Tyr	Leu	Thr	Ser	Lys	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	
			180					185						190		
Gly	Gly	Gly	Gly	Leu	Asp	Arg	Asn	Ser	Gly	Asn	Tyr	Phe	Asn	Asp	Ala	
			195				200					205				
Lys	Glu	Glu	Ser	Asp	Ser	Glu	Asp	Ser	Val	Thr	Phe	Glu	Phe	Val	Pro	
	210						215				220					
Asn	Thr	Lys	Lys	Gln	Lys	Cys	Gly	Thr	Pro	Thr	Pro	Val	Asn	Pro	Ser	
	225					230				235					240	

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)



Thr	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Thr	Pro	Thr	Phe	Ala	Lys	Leu	Gln	Glu
				245					250					255	
Phe	Gly	Ser	Ser	Pro	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Gly	Pro	Gln	Pro	Gly	Ser
			260					265					270		
Ala	Gly	Met	Gly	Gly	Ala	Lys	Thr	Pro	Ser	Asp	Ala	Val	Gln	Asn	Ile
		275					280					285			
Leu	Gln	Lys	Ile	Glu	Lys	Ile	Lys	Asn	Thr	Glu	Glu				
	290					295					300				

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

RIVENDICAZIONI

1. Materiale proteico ricombinante atto a legare anticorpi contro il Citomegalovirus umano (HCMV), caratterizzato dal fatto che consiste in una proteina di fusione comprendente una prima regione costituita da almeno parte della sequenza carbossil-terminale degli ultimi 233 amminoacidi della proteina p52, una seconda regione costituita da almeno parte della sequenza carbossil-terminale degli ultimi 44 amminoacidi della proteina pp150, ed una terza regione costituita da almeno parte della sequenza, presa procedendo in direzione 5'-->3', di amminoacidi da 595 a 614 della proteina pp150; dette regioni essendo tra loro comunque disposte nella proteina di fusione.
2. Materiale proteico ricombinante secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che le dette regioni includono per interno le dette sequenze di amminoacidi della p52 e della pp150.
3. Materiale proteico ricombinante secondo la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto di comprendere in sequenza, procedendo in direzione 5'-->3': la detta prima regione, immediatamente a valle della quale è disposta la detta terza regione, e poi la detta seconda regione, che è disposta a valle della detta terza regione, tra le dette terza e seconda regione essendo inserita una sequenza ponte.
4. Materiale proteico ricombinante secondo la rivendicazione 3, caratterizzato dal fatto che detta sequenza ponte è costituita, procedendo in direzione 5'-->3' dalla seguente serie di amminoacidi:

lys leu gln glu phe.
5. Materiale proteico ricombinante secondo una delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che la detta proteina di fusione comprende almeno una parte di β -Galattosidasi.

6. Materiale proteico ricombinante atto a legare anticorpi contro il Citomegalovirus umano (HCMV), caratterizzato dal fatto di comprendere una proteina di fusione, almeno una parte degli amminoacidi della quale è codificata dalla sequenza di nucleotidi SEQ ID NO: 1, letta a partire dal nucleotide 001 e fino al nucleotide 900.
7. Plasmide inseribile in un organismo ospite procariota od eucariota, caratterizzato dal fatto di possedere, in combinazione, una prima sequenza di DNA codificante per almeno parte degli ultimi 233 amminoacidi carbossil-terminali della proteina p52 del HCMV, una seconda sequenza di DNA codificante per almeno parte degli ultimi 44 amminoacidi della sequenza carbossil-terminale della proteina pp150, ed una terza sequenza di DNA codificante per la sequenza di amminoacidi compresa, procedendo in direzione 5'-->3', tra l'amminoacido 595 all'amminoacido 614 inclusi della proteina pp150.
8. Plasmide secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto di includere parti selezionate della sequenza di DNA di SEQ ID NO: 1.
9. Plasmide secondo la rivendicazione 7, caratterizzato dal fatto di includere per intero la sequenza di DNA di SEQ ID NO: 1.
10. Plasmide inseribile in un organismo ospite procariota od eucariota, in particolare E.coli, caratterizzato dal fatto di essere costituito da un vettore espressivo pROS, nel quale è stata inserita la sequenza di DNA SEQ ID NO: 1, in corrispondenza del sito SmaI, a partire dal nucleotide 002 e fino al nucleotide 907.
11. Plasmide inseribile in un organismo ospite procariota od eucariota, in particolare Pichia pastoris, caratterizzato dal fatto di essere costituito da un vettore espressivo pHIL-D1, nel quale è stata inserita la sequenza di DNA SEQ ID NO: 1, in corrispondenza del sito EcoRI, a partire dal nucleotide 002 e fino al nucleotide 907.
12. Organismo ospite ricombinante comprendente il plasmide secondo una delle

rivendicazioni da 7 a 11, atto a produrre una proteina di fusione comprendente una prima regione costituita da almeno parte della sequenza carbossil-terminale degli ultimi 233 amminoacidi della proteina p52, una seconda regione costituita da almeno parte della sequenza carbossil-terminale degli ultimi 44 amminoacidi della proteina pp150, ed una terza regione costituita da almeno parte della sequenza, presa procedendo in direzione 5'→3', di amminoacidi da 595 a 614 della proteina pp150; dette regioni essendo tra loro comunque disposte nella proteina di fusione.

13. Materiale proteico ricombinante atto a legare anticorpi contro il Citomegalovirus umano (HCMV), caratterizzato dal fatto che consiste in una proteina di fusione espressa in un organismo ospite in cui è stato inserito un plasmide secondo una delle rivendicazioni da 7 a 11.

14. Reagente diagnostico per la determinazione sierologica di uno stato di infezione da HCMV, caratterizzato dal fatto di comprendere una proteina di fusione secondo una delle rivendicazioni da 1 a 6 e 13.

15. Reagente diagnostico per la ricerca sierologica diretta del Citomegalovirus umano e/o di antigeni dello stesso, comprendente almeno un siero policlonale monospecifico contro la proteina di fusione secondo una delle rivendicazioni da 1 a 6 e 13.

16. Reagente diagnostico per la ricerca sierologica diretta del Citomegalovirus umano e/o di antigeni dello stesso comprendente anticorpi monoclonali (MaB) diretti contro la proteina di fusione secondo una delle rivendicazioni da 1 a 6 e 13.

17. Reagente diagnostico per la determinazione sierologica di uno stato di infezione da HCMV, caratterizzato dal fatto di comprendere una proteina di fusione almeno una parte degli amminoacidi della quale è costituita dalla sequenza SEQ ID NO: 2.

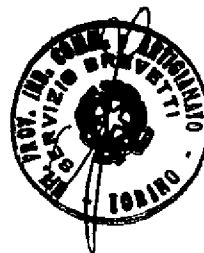
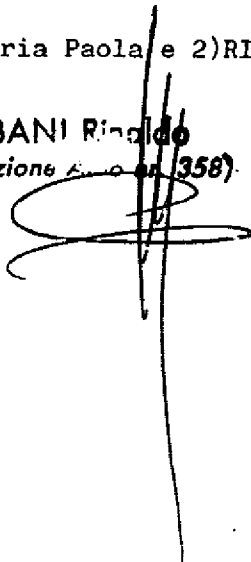
18. Kit diagnostico per la determinazione sierologica della presenza di anticorpi

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

verso il Citomegalovirus umano (HCMV), caratterizzato dal fatto di comprendere un reagente diagnostico secondo una delle rivendicazioni da 14 a 17, eventualmente adsorbito su un supporto solido.

p.i.: 1) LANDINI Maria Paola e 2) RIPALTI Alessandro

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)



PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)

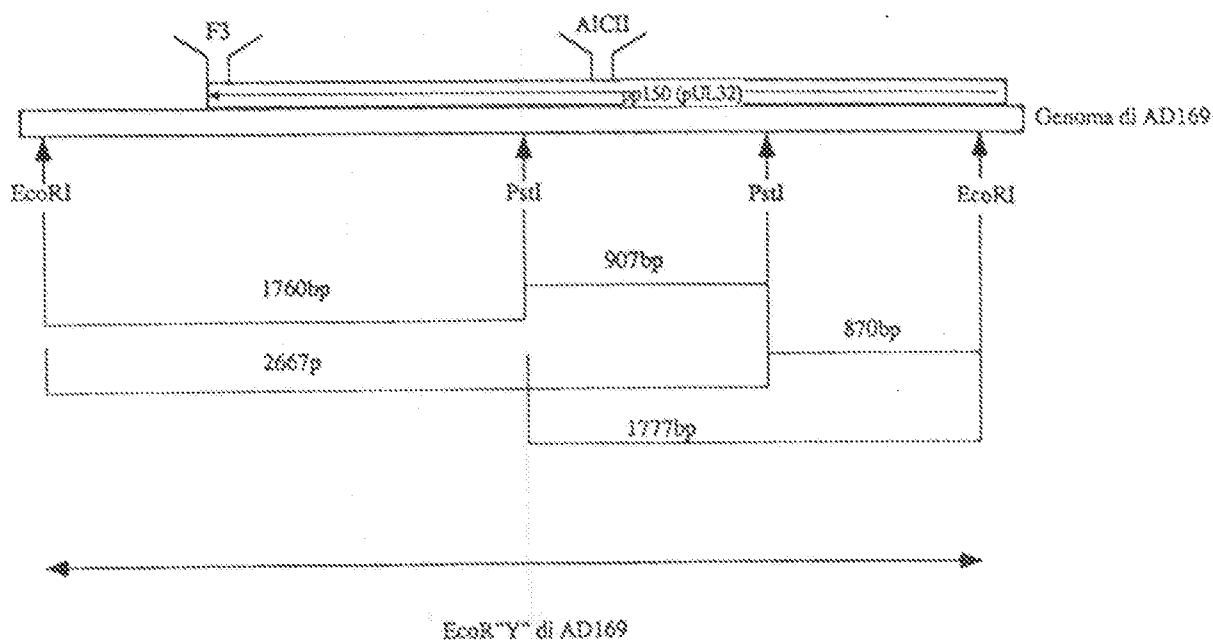


Fig. 1

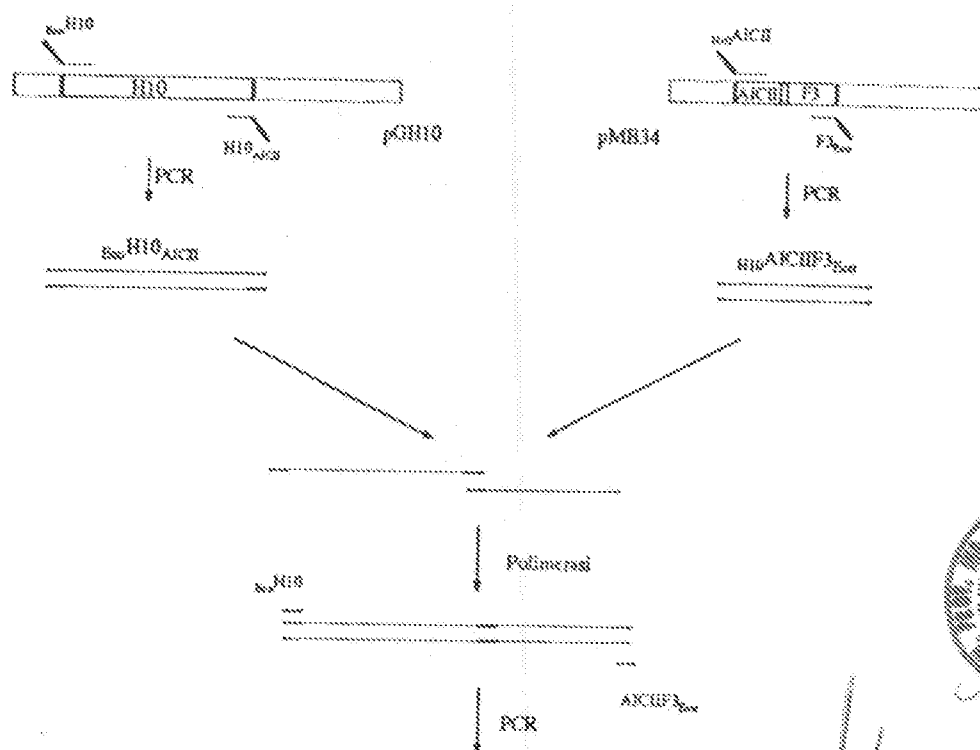
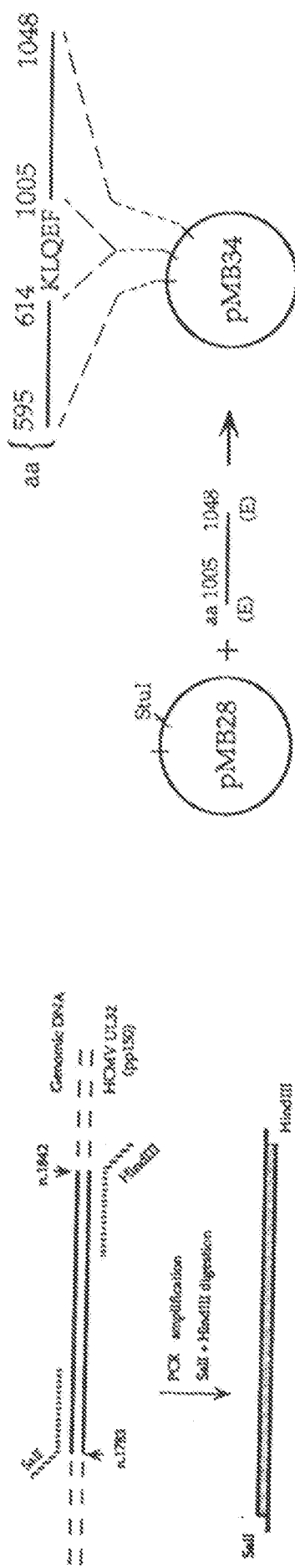


Fig. 5

p.i.: 1) LANDINI Maria Paola e 2) RIPALTI Alessandro

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)





p.i.: 1) LANDINI Maria Paola e 2) BIPALTI Alessandro

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione n. 358)

Fig. 4

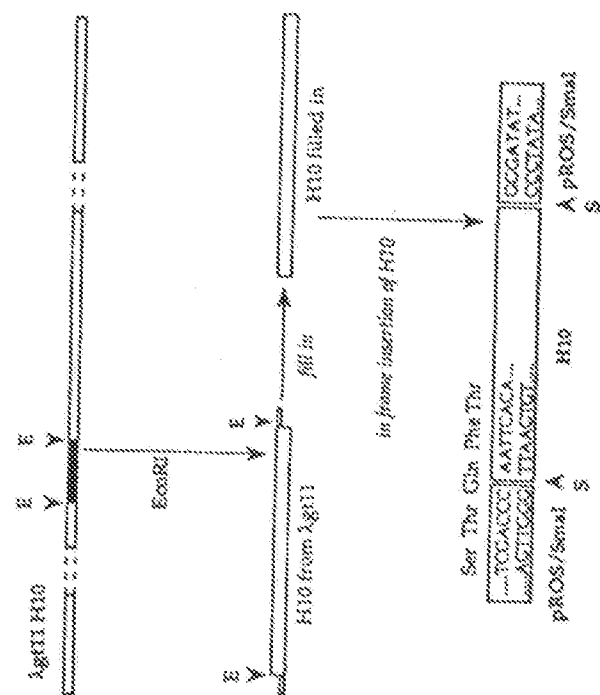
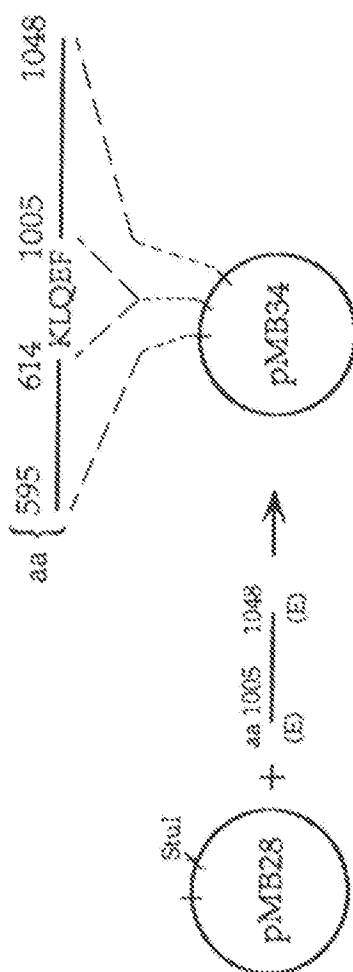


Fig. 3

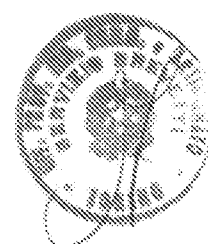
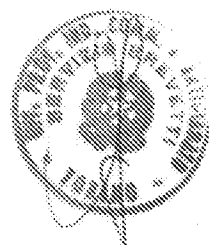


Fig. 2

TABELLA 1

ELISA (IgG) con		ELISA (IgG) con le seguenti proteine di fusione														
CMV intero		F3			A1C2			A1C2/F3			H10			A1C2/F3/H10		
N	media (intervallo)	N.	media (intervallo)	N.	media (intervallo)	N.	media (intervallo)	N.	media (intervallo)	N.	media (intervallo)	N.	media (intervallo)	N.	media (intervallo)	
28	291 (242-330)	19	75 (17-180)	10	41 (17-43)	20	172 (40-490)	19	214 (168-501)	27	176 (140-641)					
40	576 (434-705)	40	434 (53-2079)	22	110 (12-440)	40	825 (230-2209)	39	611 (206-1038)	40	880 (120-2160)					
40	1161 (690-2138)	38	796 (50-2461)	22	114 (25-275)	38	805 (50-2351)	40	758 (300-2120)	40	940 (120-2405)					
108	TOTALE	98 (90,7%)		54 (50%)		97 (89,8%)		98 (90,7%)		107 (99,1%)						
14	0.18 (0.2-5)	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—			0	—	

Fig. 6



p.i.: 1)LANDONI Maria Paola e 2)RIPALTI Alessandro

PLEBANI Rinaldo

(iscrizione Albo nr. 358)

TABELLA 2

ELISA (IgM) con CMV intero		ELISA (IgM) con le seguenti proteine di fusione									
F3		A1C2		A1C2/F3		H10		A1C2/F3/H10			
N.	media (intervallo)	N. Positivi	media (intervallo)	N. Positivi	media (intervallo)	N. Positivi	media (intervallo)	N. Positivi	media (intervallo)	N. Positivi	media (intervallo)
20	294 (242-389)	10	521 (232-1171)	10	317 (85-612)	14	797 (210-1417)	19	578 (432-724)	20	517 (386-815)
24	516 (210-2297)	18	1090 (210-2297)	16	467 (143-1141)	22	1278 (370-2561)	23	887 (209-2270)	24	767 (298-1973)
20	1341 (881-2000)	16	1163 (451-2339)	14	1021 (202-2268)	16	1707 (521-2249)	20	1065 (579-2471)	20	1121 (421-2243)
64	TOTALE positivi (68,75%)	44	(62,5%)	40	(81,25%)	52	(96,87%)	62	(98,4%)	63	(98,4%)
5	27 (1-56)	0	---	0	---	0	---	0	---	0	---

Fig. 7



p.l.: 1) LANDINI Maria Paola e 2) RIPALTI Alessandro

PLEBANI Rinaldo
(iscrizione Albo nr. 358)