



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

UIBM

DOMANDA NUMERO	101997900598395
Data Deposito	22/05/1997
Data Pubblicazione	22/11/1998

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N		

Titolo

METODO CHE PREVEDE L'USO DI BATTERIOFAGI PER LA RIVELAZIONE DELLA PRESENZA DI MOLECOLE DI INTERESSE IN CAMPIONI BIOLOGICI
--

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE INDUSTRIALE dal titolo:
"METODO CHE PREVEDE L'USO DI BATTERIOFAGI PER LA
RIVELAZIONE DELLA PRESENZA DI MOLECOLE DI INTERESSE
IN CAMPIONI BIOLOGICI"

della ditta italiana Istituto di Ricerche di
Biologia Molecolare P. Angeletti S.p.A.
con sede in POMEZIA (ROMA)

<><><><><><><>

DESCRIZIONE

La presente invenzione ha per oggetto un metodo per la rivelazione della presenza di molecole di interesse in sorgenti biologiche. Ciò risponde ad una esigenza comune a molti settori della ricerca scientifica. La possibilità infatti di potere individuare in campioni biologici la presenza di molecole, associate ad esempio a patologie cliniche, rappresenta da sempre un importante obiettivo della ricerca, soprattutto in campo medico.

Quello bio-medico infatti è indubbiamente il principale (anche se non unico) campo di applicazione di detto metodo, considerato anche il fatto che le invenzioni, relative a metodi

finalizzati in tale senso, sono state proposte al fine di raggiungere una sempre maggiore sensibilità di rivelazione soprattutto a scopo diagnostico.

Lo strumento biochimico maggiormente utilizzato per la rivelazione della presenza di molecole specifiche in estratti cellulari o tissutali, sono gli anticorpi per la loro estrema sensibilità e per la elevata specificità di legame.

Il verificarsi della interazione con la molecola di interesse in queste metodologie viene evidenziata tramite markers coniugati agli stessi anticorpi, quali ad esempio sostanze fluorescenti, proteine dotate di attività enzimatica, o anche tramite marcatura radioattiva.

La capacità di rivelamento di tali marcatori è comunque risultata notevolmente intensificata dall'adozione dei cosiddetti metodi di amplificazione del segnale. Essi consentono di ottenere un segnale di rivelamento più forte, tramite ad esempio la coniugazione del marcatore, non più all'anticorpo utilizzato per la specifica ricognizione (anticorpo primario), ma ad un secondo anticorpo capace di legare il primo (anticorpo secondario). Sono stati elaborati diversi metodi che utilizzano anticorpi secondari cui sono

covalentemente coniugate molecole marcatrici, quali sostanze fluorescenti come la fluoresceina o la rodamina, proteine dotate di attività enzimatica quali la fosfatasi alcalina o la perossidasi del rafano, in caso di rivelazione tramite microscopio elettronico sono utilizzate anche la ferritina o sfere di oro colloidale.

Sistemi alternativi di amplificazione sfruttano invece la elevata affinità di legame tra molecole quali la Biotina (una piccola vitamina idrosolubile) e la Streptavidina (proteina batterica), oppure quella tra le lectine (proteine capaci di riconoscere e legare specifici residui saccaridici) con molecole quali glicoproteine, glicolipidi o proteoglicani.

E' possibile una serie molto ampia di varianti su questo tema, comprese quelle che consentono la creazione di una rete di marcatori, in grado di amplificare notevolmente il segnale di rivelamento. Comunque tutti questi metodi sono legati all'utilizzazione di anticorpi quali molecole in grado di individuare specificamente una molecola bersaglio, e presentano inoltre una soglia di sensibilità comunque limitata dalla concentrazione delle molecole di bersaglio.

Quest'ultima limitazione è stata superata dai metodi più recentemente elaborati, che si basano sull'applicazione a questo scopo delle tecniche di PCR (Polimerase Chain Reaction), qui utilizzata al posto degli enzimi di rivelamento. Questi metodi, infatti, si basano sempre sull'uso di anticorpi monoclonali contro uno specifico ligando, che in questo caso però vengono accoppiati fisicamente non con proteine ma con polinucleotidi di sequenza nota.

Questo consente di operare il successivo rivelamento tramite l'amplificazione della sequenza di DNA nota, realizzata efficientemente con una reazione di polimerizzazione a catena (PCR) (1-3).

Questa tecnica, denominata immuno PCR consente di rivelare virtualmente anche un sola molecola di DNA presente, ed in conseguenza anche un solo anticorpo legato alla molecola bersaglio. Nonostante il notevole miglioramento nella sensibilità, questi metodi presentano una serie di inconvenienti, tra cui la diretta associazione tra polinucleotide ed anticorpi, ed il conseguente elevato background dovuto alla inevitabile interferenza da parte del polinucleotide, nella fase di legame dell'anticorpo con la molecola di

interesse.

Inoltre, dato che la specificità e la resa della reazione di amplificazione dipendono dalla temperatura a cui i reagenti vengono mescolati, è possibile ottenere, se l'assemblaggio della reazione di PCR avviene a temperature inferiori a quella ottimale di ibridazione dei primers, dei prodotti aspecifici di ibridazione.

Attualmente questo problema è stato risolto con l'addizione alla reazione di amplificazione di un reagente essenziale, solo dopo che il sistema ha raggiunto la temperatura che favorisce l'ibridazione specifica dei primers "Hot Start". Tale procedimento è realizzato separando meccanicamente un reagente (4), oppure bloccando l'attività enzimatica della DNA polimerasi con anticorpi (5).

Recentemente è stato inoltre sviluppata una tecnica di PCR eseguita su cellule, denominata PCR in situ (6), in cui la amplificazione segue una reazione di ibridazione in sito. Secondo questo metodo il DNA stampo ed i primers sono tenuti fisicamente separati fino al momento della lisi della cellula, con il vantaggio di evitare il verificarsi di reazioni aspecifiche di ibridazione

(EP 524808 Hoffmann La Roche Inc.).

Risultano inoltre una serie di brevetti tutti relativi a nuovi metodi diagnostici che dovrebbero consentire il superamento di molti inconvenienti propri dei metodi attuali, ed un conseguente miglioramento della amplificazione del segnale di risposta. Essi hanno per oggetto differenti metodologie, quali l'uso della PCR associata alla scoperta di particolari proteine (WO9421676); l'uso di enzimi ibridi geneticamente ingegnerizzati e coniugati a ligandi, quali ad esempio epitopi del virus HIV-1 (WO942636); l'uso di epitopi virali generati da acidi nucleici combinati con proteine leganti l'antigene (WO9406934); l'uso di parti di cDNA virali, provenienti ad esempio da HCV, per esprimere un epitopo virale connesso ad una sequenza di controllo e un anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo. In quest'ultimo caso la regione di cDNA di interesse consente un controllo incrociato tra la risposta dell'anticorpo e quella conseguente all'ibridazione con il DNA (EP388232).

Un altro brevetto, invece, ha per oggetto la costruzione di una libreria di determinanti antigenici, ottenuta tramite la digestione con DNA-ase-I, del genoma di un virus ad esempio HIV, cui

fa seguito l'espressione di detti frammenti ottenuta tramite un opportuno vettore, e la successiva selezione di detti prodotti di espressione attraverso l'uso di anticorpi (EP373070).

In questo contesto il valore della presente invenzione consiste nell'avere per oggetto un metodo estremamente versatile, utilizzabile in situazioni e per finalità fortemente differenti, secondo modalità che consentono di superare diversi inconvenienti presenti nello stato della tecnica.

Il metodo dell'invenzione infatti non presuppone la produzione di anticorpi specifici, ma l'impiego di fagi filamentosi ricombinanti, che espongano sul capsido una qualunque molecola capace di interagire con la molecola di interesse nel campione in esame.

Esso inoltre consente, avendo a disposizione un fago che espone una molecola adatta, di rivelare la presenza di qualunque tipo di molecola di interesse (non solo di natura amminoacidica), anche se presente a concentrazioni infinitesime, in campioni biologici di varia origine (non solo su campioni provenienti dal corpo umano o animale, ma anche su campioni di altra natura, ad es. acqua, bevande o

sostanze alimentari). La combinazione delle operazioni, oggetto della invenzione, è inoltre articolata in modo da eliminare il rischio di associazione aspecifica tra DNA e reagenti ed il conseguente background che può inficiare la chiarezza del risultato.

Questi vantaggi sono la conseguenza del fatto che il DNA, utilizzato per il rivelamento tramite PCR, non è direttamente esposto ai reagenti, ma è contenuto all'interno dei fagi ricombinanti utilizzati.

La presenza del capsido proteico quale involucro impedisce infatti che il DNA utilizzato per il successivo rivelamento possa interferire durante la reazione di legame tra la molecola-ligando (quella esposta sul capsido) e la molecola-recettore (quella di interesse nel campione).

In seguito, avvenuta l'interazione tra molecola-ligando e molecola-recettore, con opportuni lavaggi si procede all'eliminazione dei fagi che non si sono legati con interazioni specifiche al recettore. Infine le sequenze nucleotidiche del DNA fagico sono amplificate aggiungendo i reagenti necessari secondo un procedimento che evita che si incorra in problemi

di aspecificità. Il DNA da amplificare infatti rimane protetto nelle prime fasi dalle proteine del capsido fagico che si denaturano solo al momento in cui la reazione di polimerizzazione ha inizio.

Un ulteriore vantaggio è costituito dal fatto che il fagemide ricombinante di base, utilizzato per la costruzione dei fagi recettori, è essenzialmente secreto da E. Coli come particella contenente DNA a singolo filamento. E' noto nello stato dell'arte infatti, che l'uso della PCR su DNA stampo a singola catena dà risultati migliori rispetto a quella condotta su DNA a doppio filamento.

L'invenzione sarà meglio chiarita con l'aiuto delle figure annesse.

La figura 1 mostra il risultato dell'amplificazione del DNA di un fago P787, che espone sulla superficie del capsido un peptide capace di legare anticorpi anti-HCV. La visualizzazione avviene per fluorescenza ad UV su gel d'agarosio contenente bromuro di etidio. M è un riferimento di pesi molecolari ottenuto idrolizzando il DNA plasmidico pUC19 con l'enzima di restrizione Hinf I.

La figura 2 mostra il risultato

dell'amplificazione del DNA di una miscela di fagi (mix) dopo incubazione con i sieri C17 e C22 di pazienti il cui siero contiene anticorpi anti-HCV. La visualizzazione avviene per fluorescenza agli UV su gel d'agarosio contenente bromuro di etidio. pC89 è il fago non ricombinante con cui è stata costruita la libreria di fagi, qui utilizzato come controllo negativo.

La figura 3 mostra il risultato dell'amplificazione del DNA della stessa miscela di fagi (mix), usata in figura 2, dopo incubazione con i sieri N57 e N60 di due volontari nel cui siero non sono presenti anticorpi anti-HCV e perciò considerati come controllo negativo. La visualizzazione avviene per fluorescenza agli UV su gel d'agarosio contenente bromuro di etidio. pC89 è un fago di controllo negativo già descritto nell'esempio 1. M è un riferimento di pesi molecolari ottenuto idrolizzando il DNA plasmidico pUC19 con l'enzima di restrizione Hinf I.

Oggetto della presente invenzione è un metodo per la determinazione e la misurazione della presenza di determinate molecole di interesse, denominate in questo contesto anche molecole-

recettrici, in base alla capacità di essere specificamente riconosciute almeno da una determinata molecola, qui denominata molecola-ligando, che viene esposta sul capsido fagico.

E' necessario precisare come nella presente descrizione i concetti di molecola-ligando e molecola-recettrice siano strettamente interdipendenti, e strettamente legati al particolare contesto operativo. In conseguenza, una molecola esposta sulla superficie del capsido è definita "ligando" esclusivamente in base alla sua capacità di legarsi specificamente alla molecola presuntivamente presente nel campione, la cui presenza o concentrazione si intende misurare, che viene così definita "recettore", e viceversa.

Nella presente invenzione si considera come "recettore" qualunque molecola proveniente da sorgenti quali biofluidi, superfici di cellule o di tessuti, la cui presenza possa essere identificata mediante l'interazione con un "ligando" specifico come sopra definito. Ad esempio appartengono alla categoria di "ligando", ma non la esauriscono, anticorpi in grado di riconoscere antigeni ben identificati (come antigeni virali, antigeni tumorali o antigeni presenti in tessuti normali), o

anche antigeni la cui precisa natura molecolare non sia stata ancora individuata. In questo caso, tali antigeni saranno considerati come "recettori". Queste definizioni sono legate, ad esempio, al caso in cui la presenza e/o concentrazione di tali antigeni nei fluidi biologici o sulla superficie di cellule e tessuti considerati sia un indice avente valore diagnostico. Ma in accordo con il metodo oggetto della presente invenzione gli stessi antigeni possono essere utilizzati come "ligandi" nel caso in cui la molecola-recettrice di interesse, la cui presenza o concentrazione si intenda determinare, sia costituita da anticorpi.

Allo stesso modo possono essere considerati come "recettori", se di interesse, anche recettori specifici presenti sulla membrana di singole cellule o di cellule in tessuti, come anche recettori solubili presenti in fluidi biologici, che saranno rivelati in questo caso da quelle molecole capaci di legarvisi specificamente fungendo da "ligandi". Naturalmente è possibile invertire il rapporto laddove le molecole di interesse siano costituite non più dai recettori di membrana (che in questo caso fungeranno da "ligandi"), ma dai loro specifici ligandi (che in

questo caso saranno considerati come "recettori").

Si comprende allora come possa essere inclusa nella categoria dei "recettori" qualunque molecola la cui presenza nel campione in esame sia considerata di valore diagnostico e/o prognostico (essendone stata accertata l'associazione con la manifestazione di una particolare patologia), o comunque di interesse per qualunque finalità.

Risultano piuttosto evidenti le molteplici applicazioni di questo metodo, possibili soprattutto in campo medico e veterinario, ma anche in altri campi come ad esempio quello alimentare ed ambientale.

Questo metodo è stato elaborato in seguito alla verifica, operata dagli inventori, della possibilità di utilizzare batteriofagi filamentosi, ricombinanti o meno, per rivelare l'interazione tra un "ligando" ed una molecola-recettrice presente in un campione anche a concentrazioni molto basse, mediante amplificazione di specifiche sequenze nucleotidiche presenti nel genoma del fago e fisicamente o geneticamente associate al "ligando".

In sintesi il metodo secondo l'invenzione può essere applicato ogni qualvolta si possa identificare:

A) una molecola-recettrice o una classe omogenea di "recettori" che formino un insieme, la cui presenza in fluidi biologici o sulla superficie di cellule o di tessuti sia correlata con una particolare patologia o sia comunque di rilevante interesse, ad esempio diagnostico;

B) un "ligando" o una classe di "ligandi", ad esempio di natura polipeptidica, la cui struttura consenta loro di poter essere esposti sul capsido dei batteriofagi, conservando la capacità di legarsi specificamente alla molecola-recettrice.

E' pertanto oggetto della presente invenzione, un metodo che si basa essenzialmente sulle seguenti operazioni:

a) Immobilizzare le molecole di interesse mediante un procedimento in grado di non distruggere la capacità di interazione con le molecole esposte sulla superficie del fago;

b) Far legare specificamente una molecola di interesse, immobilizzata, con almeno uno dei batteriofagi filamentosi ricombinanti, che presentano all'interno una molecola di DNA a singolo filamento di sequenza almeno in parte nota, ed espongono sulla superficie del capsido almeno una molecola capace di legare specificamente almeno

una molecola di interesse presente nel campione biologico;

c) Separare i complessi molecola-batteriofago così ottenuti dalla miscela di reazione;

d) Allontanare mediante lavaggi i complessi originati da un'interazione aspecifica molecola-batteriofago;

e) Aggiungere i reagenti per la realizzazione della operazione di cui al successivo punto g);

f) Far lisare le proteine costituenti il capsido proteico dei batteriofagi così selezionati;

g) Amplificare il DNA così ottenuto mediante reazioni a catena delle polimerasi (PCR);

h) Effettuare la rivelazione del DNA così amplificato, ad esempio tramite metodi convenzionali. Tali metodi possono essere a titolo esemplificativo l'elettroforesi su gel di agarosio in presenza di bromuro di etidio, l'elettroforesi capillare, l'ibridazione a sonde specifiche marcate radioattivamente o luminescenti.

In particolare l'operazione di cui al punto g), e cioè l'amplificazione del DNA fagico, viene realizzata tramite la tecnica di PCR, utilizzando una coppia di oligonucleotidi di cui almeno uno complementare ad una sequenza nota del DNA fagico.

Inoltre si è verificato che utilizzando un protocollo di lisi delle proteine del capsido fagico alla temperatura in cui si realizza la denaturazione del DNA, che cade solitamente nell'intervallo di 93-96°C, si consente il contatto tra primers e DNA stampo alla stessa temperatura, e si realizza così una "Hot Start" della PCR, con la conseguente virtuale eliminazione di prodotti aspecifici di reazione.

Una importante applicazione di questo metodo si ha nel caso in cui le molecole di interesse sono anticorpi.

Una ulteriore particolare applicazione si ha quando la immobilizzazione delle molecole di interesse viene effettuata su fase solida, ed in questo caso a sua volta quando è realizzata tramite adsorbimento passivo e/o utilizzando anticorpi specifici per le molecole stesse.

L'operazione di immobilizzazione comunque può essere anche realizzata tramite l'uso di batteri o di almeno una delle proteine batteriche scelte dal gruppo comprendente la proteina A dello *Staphylococcus Aureus*, la proteina G degli *Streptococchi* del gruppo C ed ogni altra proteina batterica capace di legare le immunoglobuline

animali.

Ulteriori applicazioni del metodo, di particolare interesse, sono quelle in cui i batteriofagi utilizzati espongono sulla superficie del capsido antigeni virali, auto-antigeni (antigeni che possono essere presenti nell'animale sorgente dei fluidi biologici), allergeni, recettori di membrane cellulari, parti di tali molecole oppure oligopeptidi in grado di mimarne la presenza nei fluidi biologici in esame, così come anche recettori di membrane cellulari specifici o peptidi da essi derivati, o ligandi di natura amminoacidica il cui recettore sia presente nei fluidi da testare.

Tra gli aspetti fondamentali del metodo vi è innanzitutto il fatto che, lo strumento utilizzato per il rivelamento sono sempre batteriofagi filamentosi generalmente del tipo M13, f1 e fd ricombinanti, che consentono di esporre sulla superficie del capsido una o più molecole preferibilmente di natura amminoacidica che fungono da "ligando", capaci di interagire specificamente con il "recettore" che si intende saggiare. Questo costituisce un primo elemento di originalità, posto che si utilizzano non più direttamente molecole-

ligando, ma fagi che contengono "ligandi" naturali, loro parti o loro mimi, opportunamente selezionati.

La presente invenzione infatti si distingue da altri metodi di rivelazione precedentemente descritti, come la immuno-PCR, dove un anticorpo è legato artificialmente ad una molecola polinucleotidica di sequenza nota usata come sonda, proprio per il fatto che in questa invenzione si utilizza l'informazione genetica contenuta all'interno del fago per determinare la presenza di una molecola di interesse.

Inoltre, la possibilità di utilizzare contemporaneamente fagi diversi consente di rivelare simultaneamente parti differenti di una molecola di interesse o anche più molecole di interesse.

Ma la caratteristica principale è soprattutto l'associazione tra il "ligando" esposto sulla superficie del fago, ed il DNA fagico, utilizzato per il rivelamento tramite PCR. Esso può essere costituito dall'informazione genetica codificante per il "ligando", ma anche più in generale da qualsiasi sequenza nucleotidica del genoma fagico.

In conseguenza il metodo oggetto dell'invenzione consente anche di scegliere

opportunamente le sequenze nucleotidiche associate al "ligando" da utilizzare per il rivelamento, in modo da aumentare la specificità e diminuire il tempo della reazione di amplificazione. Infatti, per la realizzazione di una reazione di PCR, la sequenza dei primers oligonucleotidici, la durata e la temperatura cui viene condotta ogni incubazione, ed il numero di cicli di ogni reazione, possono essere in questa sede prescelti in modo da ottenere una amplificazione molto rapida ed altamente specifica.

Per sua natura, infatti, l'informazione genetica presente all'interno del fago ed utilizzata per il rivelamento si presta particolarmente bene ad essere amplificata con le correnti tecniche di PCR, che permettono di evidenziare la presenza anche di una singola molecola di DNA nel tubo di reazione. La sensibilità che è possibile ottenere con la reazione di polimerizzazione a catena non è facilmente raggiungibile con altri metodi di rivelazione attualmente in uso.

Un ulteriore vantaggio conseguente è strettamente legato al fatto che le sonde di oligonucleotidi usate per l'amplificazione possono

essere disegnate in modo tale da amplificare specificamente una particolare sequenza presente in un fago, anche in presenza di DNA di altri fagi che non la ricomprensano. Ad esempio è possibile disegnare le sonde in modo da amplificare esclusivamente il DNA di fagi che contengano un inserto specifico (ad esempio quello che codifica per la molecola che funge da "ligando" quando è esposto sul capsido), anche in presenza di DNA di fagi che non contengano tale inserto, o che contengano inserti di sequenza differente. La più diretta conseguenza di ciò è che è possibile far reagire la molecola-recettrice (o le molecole-recettrici) oggetto dell'esame con un miscuglio di fagi differenti, ed identificare il legame con ogni singolo tipo di fago anche in presenza degli altri.

Inoltre, il fatto che il DNA sia contenuto all'interno del capsido proteico, consente di superare uno dei limiti nella specificità di rivelazione proprio della tecnica di PCR. Questo limite è costituito dalla necessità di mettere a contatto il DNA stampo con le sonde di amplificazione a temperatura relativamente bassa, in dipendenza della sequenza dei due primers. Quando la temperatura viene innalzata per iniziare

il primo ciclo di amplificazione, parte del DNA resta complessato alla sonda e questo risulta in una elongazione aspecifica della sonda stessa sul DNA stampo. Varie metodologie sono state proposte per porre rimedio a questo inconveniente (4,5). Il metodo oggetto della presente invenzione, come già anticipato, consente di risolvere brillantemente il problema, sfruttando il fatto che si fa uso di DNA che è naturalmente incapsidato, e quindi protetto dal contatto con le sonde specifiche fino al momento della lisi del capsido. In relazione a ciò, una specificità estremamente elevata è raggiungibile, semplicemente mettendo a punto ed utilizzando un protocollo di lisi termica che permette il contatto DNA-sonda specifica solo ad alta temperatura.

In questo modo piuttosto semplice nella realizzazione ed estremamente pratico, si ottiene quello che in termine tecnico è definito "Hot Start" della PCR

Si è data finora della presente invenzione una descrizione di carattere generale. Con l'aiuto dei seguenti esempi, verrà ora fornita una descrizione più dettagliata di specifiche forme di realizzazione finalizzate a far meglio comprendere

scopi, caratteristiche, vantaggi e modalità operative dell'invenzione. Tali esempi sono solo illustrativi, e non limitano la portata della presente invenzione, che è definita dalle rivendicazioni annesse.

ESEMPIO 1

Procedimento per la rivelazione, in sieri di pazienti, della presenza di anticorpi specifici per antigeni del virus dell'epatite C (HCV) umana

E' stato adottato il seguente procedimento secondo l'invenzione:

Aliquote di immunoglobine di capra-anti-IgG umane, specifiche per la porzione Fc, sono state adsorbite in pozzetti di una piastra in policarbonato costituita da 96 pozzetti correntemente in uso per tecniche di PCR (Thermowell-II™ type 6509 della Costar). Dopo incubazione la piastra è stata lavata con un tampone salino di fosfati, e i residui siti di assorbimento sono stati bloccati mediante incubazione in un tampone in cui è risospeso latte magro in polvere (come descritto in arte). Nei pozzetti della piastra così preparata si dispensano: 1) aliquote del siero umano in esame a diverse diluizioni; in questo esempio sono usati i

sieri umani C17 e C22 di pazienti infetti con HCV e contenenti anticorpi anti HCV. N57 e N60 sono sieri da individui apparentemente sani e in cui non sono stati trovati anticorpi anti HCV. Aliquote di questi sieri sono mescolate con un fago di tipo non ricombinante che funziona da "carrier" non specifico. Inoltre si aggiunge 2A un fago ricombinante che può essere amplificato nella reazione di PCR ma che non espone sul capsido il ligando specifico, in questo esempio peptidi che siano in grado di legare anticorpi umani anti HCV; ed in alternativa 2B il fago P787 HCV specifico.

Dopo incubazione a 37° per 90 minuti, la piastra viene svuotata e lavata con tampone di fosfati per allontanare tutti i fagi ricombinanti non specificamente legati. In ogni pozzetto si aggiunge quindi una mistura contenente le sonde di DNA specifiche per l'amplificazione, la polimerasi Taq, deossinucleotidi trifosfati, in un tampone adatto alla reazione di PCR.

La piastra è trasferita in un termoincubatore per PCR e si procede con cicli di reazione che iniziano con un riscaldamento per 5 minuti a 95°C. questo passaggio è particolarmente importante perché solo a questa temperatura avviene la lisi

delle proteine fagiche, e di conseguenza il contatto delle sonde specifiche con il DNA da amplificare. La reazione di PCR inizia quindi ad alta temperatura (hot start) e prosegue con 25 cicli di 10 secondi a 94°C e 10 secondi a 72°C. La reazione termica con incubazione a 72°C per 2 minuti.

Il DNA del fago P787 così amplificato viene evidenziato per elettroforesi su gel di agarosio contenente bromuro di etidio, come mostrato nell'esempio specifico in figura 1.

ESEMPIO 2

Uso di una composizione di fagi per diagnosticare la presenza di anticorpi anti-HCV in siero di pazienti

Una composizione di più fagi selezionati specificamente, ciascuno dei quali mima diverse regioni proteiche del virus dell'epatite C umana, è stata usata per diagnosticare in un siero la presenza di anticorpi anti-HCV. Poiché i fagi possono essere distinti in base alla sequenza che portano ma anche e più semplicemente, in base alla lunghezza dell'inserito, è possibile osservare su gel d'agarosio l'amplificazione di frammenti di DNA di diversa lunghezza in base alle dimensioni

dell'inserito nel DNA fagico.

In questo esempio è mostrato come usando una miscela di fagi è possibile avere una risposta su gel d'agarosio secondo quanto descritto nell'esempio 1. L'esempio mostra che una miscela di fagi è più predittiva dell'uso di un singolo fago.

Rimane sorprendente come in un siero, si possano identificare anticorpi contro antigeni diversi e come la risposta di amplificazione sia specifica. Il risultato mostrato in figura 2 e figura 3 consiste comunque in una risposta che si può analizzare per elettroforesi come già descritto nell'esempio 1.

ESEMPIO 3

Procedimento di rivelazione in vitro di anticorpi anti IL-6 umana

E' descritto un procedimento in cui il recettore per IL-6 viene immobilizzato su piastra e fagi esprimanti IL-6 vengono usati per rivelarne la presenza in terreni di coltura extracellulari.

Il cDNA umano codificante per hIL-6 è stato fuso all'estremità amino terminale del gene III di un fagemide derivato da M13 secondo come descritto in arte. Il fago ricombinante hIL-6/M13-pIII può essere usato per rivelare la presenza del recettore

umano dell'interleuchina 6. già in arte è stato descritto come è possibile selezionare un fago esprimente hIL-6 che è in grado di legare in vitro sia hIL-6/R che anticorpi anti-hIL-6 come descritto in letteratura. Noi abbiamo mostrato che il riconoscimento è possibile e più efficiente se si usa il metodo descritto nella presente invenzione.

Su un supporto solido, ad esempio una biglia di plastica, sono fissati 1µg di anticorpi monoclonali anti hIL-6 in 10mM di NaHCO₃ a pH 9.2 per incubazione a 4°C durante la notte. Dopo il blocco in 1ml di TBS/&BSA per 4 ore a 4°C le biglie vengono incubate tutta la notte con hIL-6 a 4°C. Le biglie sono soggette per due volte ad un lavaggio con 2 ml di TBST seguito da incubazione per 1 ora in 1 ml di TBST/0.1% BSA a 20°C. Successivamente i fagi sono eluiti in 500µl di 100mM glicina Hcl pH 2.2 e l'eluato viene neutralizzato con 3M Tris Hcl pH 8.9. I fagi legati agli anticorpi possono essere rivelati per PCR, secondo quanto descritto nell'invenzione.

ESEMPIO 4

Procedimento per la rivelazione della forma solubile del recettore umano per IL-6 nel mezzo di coltura di cellule CHO ingegnerizzate

E' descritto un procedimento in cui il recettore dell'IL-6 umana, espresso in cellule di carcinoma ovarico ingegnerizzate, viene rivelato secondo il metodo descritto nella presente invenzione e possibilmente quantificato usando fagi in grado di esprimere IL-6 o superantagonisti di IL-6.

Una linea cellulare di CHO (CsRh14) è in grado di secernere una forma solubile del recettore per l'interleuchina 6(ref). Utilizzando 100 µl di tosyl-activated Dynabeads M450 (Unipath) è stata preparata una forma concentrata, usando in concentratore di particelle magnetiche, lavate con 50 mM borato di sodio a pH 9.5 e incubando per 24 ore a 25°C in 400 µl dello stesso tampone contenente 15 µg di anticorpi monoclonali anti hIL-6Rα. Dopo un passaggio saturante in TBS/0.1%BSA per 12 ore a 4°C, le biglie sono state incubate per 4 ore a 25°C con 400 µl di mezzo condizionato privo di siero, proveniente dalla linea CsRh14, contenente 250 ng di shIL-6Rα. Dopo alcuni lavaggi le biglie a cui è stata legata shIL-6Rα sono state incubate con i fagi esprimenti hIL-6 (in un rapporto di 1:4) per 16 ore a 4°C. Il volume della reazione è stato portato ad 1 ml aggiungendo

un'appropriata quantità di TBS/0.1%BSA. Le biglie sono state lavate 3 volte con 1 ml di TBST e i fagi eluiti in 400 ml di 100 mM di un tampone citrato a pH 3.2. Dopo la neutralizzazione con 3M Tris HCl pH 8.9 i fagi legati sono stati rivelati amplificando per PCR come nella natura della presente invenzione.

R M 97 A 0304

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per la determinazione della presenza di molecole di interesse in campioni biologici, caratterizzato dal fatto di comprendere in combinazione le seguenti operazioni:

a) Immobilizzare le molecole di interesse, mediante un procedimento in grado di non distruggere la capacità di interazione con le molecole presenti sulla superficie del fago;

b) Far legare almeno una molecola di interesse immobilizzata, con almeno uno dei batteriofagi filamentosi, ricombinanti, che presentano all'interno una molecola di DNA a singolo filamento di sequenza almeno in parte nota, ed espongono sulla superficie del capsido almeno una molecola capace di legare specificamente almeno una molecola di interesse presente nel campione biologico;

c) Separare i complessi molecola-batteriofago così ottenuti dalla miscela di reazione;

d) Allontanare mediante lavaggi i complessi originati da un'interazione aspecifica molecola-batteriofago;

e) Aggiungere i reagenti per la operazione di cui al successivo punto g);

f) Far lisare le proteine costituenti il capsido proteico dei batteriofagi così selezionati;

g) Amplificare il DNA così ottenuto mediante reazioni a catena delle polimerasi (PCR);

h) Effettuare la rivelazione del DNA così amplificato, ad esempio tramite metodi convenzionali.

2. Metodo per la determinazione della presenza di molecole di interesse secondo la rivendicazione 1, in cui la operazione di cui al punto f) è eseguita ad una temperatura alla quale si verifica la denaturazione del DNA, che costituisce un passaggio della successiva operazione di cui al punto g), segue immediatamente la lisi delle proteine del capsido, ed avviene alla stessa temperatura, realizzando in tal modo una "Hot Start" della PCR.

3. Metodo per la determinazione della presenza di molecole di interesse in campioni biologici secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui le molecole di interesse sono anticorpi.

4. Metodo per la determinazione della presenza di molecole di interesse in sorgenti biologiche come da una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, in

cui le molecole di interesse sono immobilizzate su fase solida.

5. Metodo per la determinazione della presenza di molecole di interesse in sorgenti biologiche come da rivendicazione 4, in cui l'immobilizzazione su fase solida delle molecole di interesse avviene per adsorbimento passivo.

6. Metodo per la determinazione della presenza di molecole di interesse in sorgenti biologiche come da rivendicazione 4, in cui l'immobilizzazione delle molecole di interesse su fase solida avviene tramite l'uso di anticorpi specifici per le molecole stesse.

7. Metodo per la determinazione della presenza di molecole di interesse in campioni biologici come da rivendicazione 3, in cui l'immobilizzazione delle molecole in fase solida avviene tramite l'uso di batteri o di almeno una delle proteine batteriche, scelte dal gruppo comprendente la proteina A dello *Staphylococcus Aureus*, la proteina G degli *Streptococchi* del gruppo C ed ogni altra proteina batterica capace di legare le Immunoglobuline animali.

8. Metodo per la rivelazione della presenza di molecole di interesse in campioni biologici come da

una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, in cui i batteriofagi espongono sulla superficie del capsido antigeni virali, loro parti oppure oligopeptidi in grado di mimare gli effetti della loro presenza nei fluidi biologici in esame.

9. Metodo per la rivelazione della presenza di molecole di interesse in campioni biologici come da una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, in cui i batteriofagi espongono sulla superficie del capsido auto-antigeni, loro parti o oligopeptidi in grado di mimare gli effetti della loro presenza nei fluidi biologici in esame.

10. Metodo per la rivelazione della presenza di molecole di interesse in campioni biologici come da una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, in cui i batteriofagi espongono sulla superficie del capsido allergeni, loro parti oppure oligopeptidi che mimano gli effetti della loro presenza nei fluidi biologici in esame.

11. Metodo per la rivelazione della presenza di molecole di interesse in campioni biologici come da una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, in cui i batteriofagi espongono sulla superficie del capsido recettori di membrane cellulari, parti di

tali recettori, oppure oligopeptidi in grado di mimarne l'azione biologica.

12. Metodo per la rivelazione della presenza di molecole di interesse in campioni biologici come da una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, in cui i batteriofagi espongono sulla superficie del capsido recettori specifici di membrane cellulari o peptidi da essi derivati.

13. Metodo per la rivelazione della presenza di molecole di interesse in campioni biologici come da una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, in cui i batteriofagi espongono sulla superficie del capsido ligandi di natura amminoacidica il cui recettore sia presumibilmente presente nei fluidi da testare.

14. Metodo per la rivelazione della presenza di molecole di interesse in campioni biologici come da una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, in cui i batteriofagi espongono congiuntamente sulla superficie del capsido le molecole di cui alle rivendicazioni 11, 12, 13, 14, 15, e/o 16.

15. Metodo per la rivelazione della presenza di molecole di interesse in campioni biologici come precedentemente descritto, esemplificato e rivendicato.

R M 97 A 0304

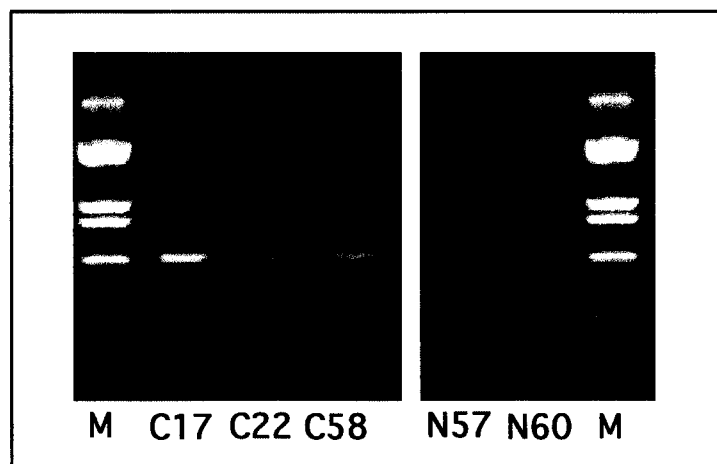


Fig. 1

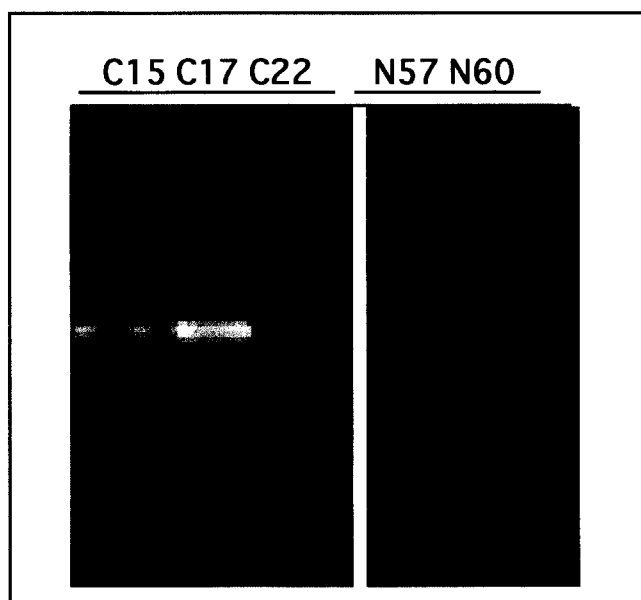
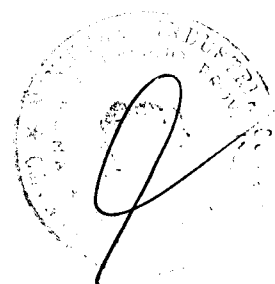


Fig. 2



p.p. ISTITUTO DI RICERCHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE P. ANGELETTI S.p.A.

Alberto Tonon
(Iscr. Albo n. 83)

R M 97 A 0304

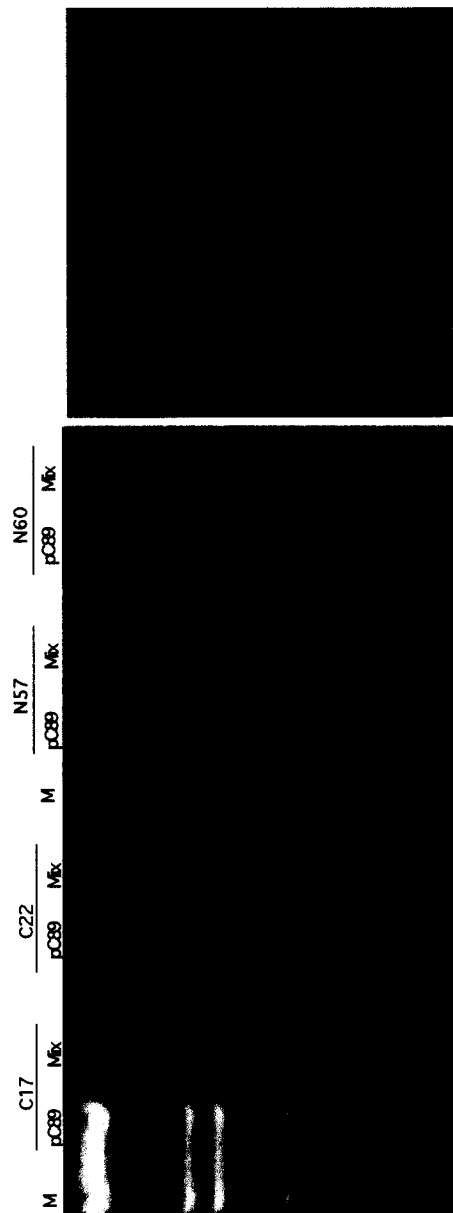


Fig 3



p.p. ISTITUTO DI RICERCHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE P. ANGELETTI S.p.A.

Gilberto Tonon
(Iscr. Albo n. 83)