



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

# UIBM

<b>DOMANDA NUMERO</b>	<b>101996900538210</b>
<b>Data Deposito</b>	<b>16/08/1996</b>
<b>Data Pubblicazione</b>	<b>16/02/1998</b>

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	01	N		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	Q		

Titolo

SAGGIO WESTERN BLOT PERFEZIONATO PER L'INDIVIDUAZIONE DI ANTICORPI SPECIFICI  
CONTRO IL VIRUS HCMV

## DESCRIZIONE

di Brevetto per Invenzione Industriale,

- di (1) ABBOTT LABORATORIES, di nazionalità Statunitense, e  
(2) LANDINI MARIA PAOLA, (3) LAZZAROTTO TIZIANA e  
(4) RIPALTI ALESSANDRO, tutti di nazionalità Italiana

rispettivamente a

- (1) ABBOTT PARK, IL 60064-3500 (U.S.A.), 100 ABBOTT PARK ROAD  
(2) 40127 BOLOGNA - VIA S. APOLLONIA, 2  
(3) 39100 BOLZANO - VIA ROVIGO, 13  
(4) 40136 BOLOGNA - VIA PETRARCA, 25

Inventori: **LANDINI Maria Paola, LAZZAROTTO Tiziana, MAINE**

**Gregory T., RIPALTI Alessandro**

TO 96A000705

\*\*\* \*\*

La presente invenzione si riferisce ad uno strumento diagnostico per l'individuazione nel siero umano di anticorpi specifici contro Citomegalovirus umano (HCMV); la presente invenzione si riferisce inoltre ad una forma perfezionata di saggio Western blot per l'individuazione di anticorpi anti-HCMV facente uso di tale strumento diagnostico, tale saggio avendo un elevato grado di affidabilità e potendo perciò essere assunto come vantaggioso standard di riferimento nel controllo sierologico dei risultati di un primo test eseguito con tecniche tradizionali, come l'analisi immuno-enzimatica (EIA), nonché rappresentare un saggio a sé stante per la ricerca degli anticorpi anti HCMV. L'invenzione si riferisce inoltre a un metodo di individuazione nel siero umano delle IgM e/o IgG e/o IgA specifiche di Citomegalovirus usando tale saggio Western blot perfezionato. L'invenzione si riferisce infine alle proteine ricombinanti

**PLEBANI Rinaldo**  
(iscrizione Albo nr 358/BM)

di fusione utilizzate, insieme ad altri antigeni virali ottenuti da virioni purificati, in tale metodo e ai plasmidi esprimenti tali proteine.

HCMV è un agente di infezione ubiquitario dell'uomo. Esso è raramente patogeno negli adulti sani ma è associato con diversi disturbi in individui immunodepressi. Inoltre, HCMV è la più comune causa di infezioni congenite nell'uomo, e le infezioni primarie materne sono seconde solo alla sindrome di Down come causa nota di ritardi mentali nel neonato [2].

La diagnosi sierologica dell'infezione da HCMV si effettua di solito per mezzo di test immuno-enzimatici (EIA) che impiegano come materiale antigenico o il virus stesso, purificato a differenti gradi, o lisati di cellule infette. I diversi kit commerciali attualmente disponibili sul mercato per l'effettuazione di tali test, però, non sono riferibili ad alcuno standard e pertanto i risultati che forniscono sono spesso poco in accordo gli uni con gli altri, risultando, alcuni, troppo specifici e scarsamente sensibili, e altri troppo sensibili e poco specifici [6], fornendo nel complesso un alto numero di risposte falsamente positive o negative.

A questo riguardo, è ben noto che l'analisi sierologica condotta con il metodo "Western blot", sebbene risulti più costosa e richieda tempi più lunghi rispetto ai test EIA, è anche molto più affidabile di questi, soprattutto riguardo alla specificità del risultato finale. Questa, tra l'altro, è la ragione per cui, nel caso di infezioni da HIV, un test Western blot (spesso indicato semplicemente come "WB") è sempre usato per confermare un test EIA dubbio.

Sicuramente, la sostanza antigenica più efficace per le indagini sierologiche per HCMV è il virus stesso. Nella procedura secondo il test Western blot tradizionale il virus, dopo purificazione delle colture di cellule infette, viene sospeso in una miscela denaturante e le sue proteine strutturali vengono frazionate

in gel preparativi di poliacrilamide. Il tipico schema di proteine così generato viene poi trasferito su un supporto solido (solitamente nitrocellulosa); le macchie ("blot") così ottenute vengono successivamente suddivise in diverse strisce di pochi millimetri di larghezza: ogni striscia viene quindi cimentata con il siero da esaminare.

Il test WB non è comunque privo di inconvenienti: in primo luogo, l'antigene strutturale del virus HCMV dotato della più elevata capacità immunogena, contro il quale è prodotta la più duratura risposta immunologica, è un polipeptide di peso molecolare 150 kD (codificato dal gene UL32 del virus stesso e indicato come ppUL32). Questo polipeptide di solito migra nel gel di poliacrilamide insieme con un altro componente strutturale del virus HCMV (codificato dal gene UL86 e indicato come ppUL86), che ha lo stesso peso molecolare e, sebbene sia una sostanza immunogena relativamente efficace, è scarsamente specifica, perché comprende epitopi antigenici in comune con le proteine omologhe degli altri virus della famiglia *Herpesviridae*, così da essere definito un "antigene di gruppo". Di conseguenza, nel caso relativamente frequente in cui la banda da 150 kD risulti la sola banda reattiva mostrata da un saggio WB, non è possibile stabilire (almeno agevolmente) se il soggetto in esame possiede anticorpi diretti contro lo specifico antigene pp150 o contro l'antigene di gruppo aspecifico ppUL86, e il risultato resta, quindi, equivoco [11].

In secondo luogo, i blot ottenuti dalle proteine virali (vp) non contengono le proteine virali non-strutturali, alcune delle quali sono sostanze immunogeniche molto forti. Per esempio, gli anticorpi diretti contro tali proteine, in particolare quelli diretti contro la fosfoproteina di 52 kD (codificata dal gene UL44 del genoma di HCMV), hanno particolare rilevanza, perché la loro presenza consente

l'individuazione sierologica dell'infezione primaria, a condizione che la presenza di questi anticorpi sia accompagnata da una debole reazione contro l'antigene strutturale principale pp150.

Sarebbe pertanto desiderabile fornire uno strumento diagnostico utilizzabile in un saggio Western blot perfezionato per l'individuazione di anticorpi specifici di HCMV nel siero umano che sia privo degli inconvenienti sopra descritti e, in particolare, sia tanto specifico e sensibile da poter costituire un vantaggioso standard di riferimento ("reference golden standard"). Sarebbe inoltre desiderabile fornire un saggio Western blot perfezionato per l'individuazione di IgM specifiche per HCMV nel siero umano.

Sarebbe anche desiderabile fornire un metodo per individuare le immunoglobuline IgM e/o IgG e/o IgA specifiche per HCMV nel siero umano con una elevata affidabilità, in modo che sia possibile riconoscere anche i risultati falsamente positivi o negativi.

Sarebbe pure desiderabile fornire i materiali proteici ricombinanti da impiegare nel saggio e nel metodo WB secondo l'invenzione stessa.

Infine, sarebbe ulteriormente desiderabile fornire plasmidi atti ad essere inseriti in organismi ospiti procarioti e/o eucarioti, così da esprimere tali materiali proteici ricombinanti, in particolare fusi con la proteina CKS.

Secondo la presente invenzione è pertanto fornito uno strumento diagnostico per l'individuazione di anticorpi contro HCMV nel siero umano, detto strumento diagnostico comprendendo un mezzo di supporto solido, una prima sezione del quale porta una pluralità di proteine virali (vp) ottenute da virioni purificati, dette proteine virali essendo concentrate in rispettive bande e le bande essendo portate da detta prima sezione del supporto solido spaziate una dall'altra secondo uno

**PLEBANI Rinaldo**  
(iscrizione Albo nr 358/BM)

schema prefissato; una di dette bande essendo formata da almeno una proteina virale di circa 150 kD di peso molecolare; detto strumento diagnostico essendo caratterizzato dal fatto che:

(i) - detto mezzo di supporto solido comprende inoltre una seconda sezione recante una pluralità di bande spaziate tra loro secondo uno schema prefissato, almeno una prima banda di detta seconda sezione includendo una singola proteina ricombinante (rp) la quale comprende una prima regione riprodotte una sequenza di aminoacidi corrispondente ad almeno un epitopo della proteina virale pp150, e una seconda regione riprodotte almeno parte della sequenza di aminoacidi di una proteina esogena, che possa essere espressa in un organismo ospite procariota o eucariota;

(ii) - almeno una seconda banda della seconda sezione includendo una proteina ricombinante la quale comprende una prima regione riprodotte una sequenza di aminoacidi corrispondente ad almeno un epitopo immunogenico di una prima proteina non-strutturale del virus HCMV, e una seconda regione riprodotte almeno parte della sequenza di aminoacidi di detta proteina esogena; e

(iii) - almeno una banda di controllo formata da detta proteina esogena.

In particolare, detta proteina ricombinante inclusa in detta prima banda della seconda sezione comprende detta prima regione, la quale riproduce una sequenza di aminoacidi (F3) corrispondente ad almeno parte della sequenza tra aa1006 e aa1048, compresi, letta in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica, della proteina virale pp150; e una terza regione, riprodotte una sequenza di aminoacidi (A1C2) corrispondente ad almeno parte della sequenza tra aa595 e aa614, compresi, letta in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica, della stessa proteina virale pp150; dette regioni potendo essere

PLEBANI Rinaldo  
iscrizione Albo nr 358/BM

variamente disposte una rispetto all'altra entro detta prima proteina ricombinante.

Inoltre, la seconda banda della seconda sezione include una proteina ricombinante, la detta prima regione della quale riproduce una sequenza di aminoacidi (H10) corrispondente ad almeno parte della sequenza tra aa202 e aa434, compresi, letta in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica, della proteina virale pp52.

Secondo una preferita forma di attuazione dell'invenzione specificamente destinata a rivelare le IgM anti-HCMV, la seconda sezione comprende inoltre, oltre ad una seconda banda di controllo comprendente aliquote di catene pesanti  $\mu$ , ulteriori due proteine ricombinanti, disposte in almeno una banda: la prima di queste comprende una prima regione riproducendo una sequenza di aminoacidi corrispondente ad almeno parte della sequenza tra aa540 e aa601, compresi, letta in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica, della proteina virale p130; ed almeno una seconda regione riproducendo almeno parte della sequenza di aminoacidi della proteina esogena; la seconda comprende una prima regione, riproducendo una sequenza di aminoacidi corrispondente ad almeno parte della sequenza tra aa1144 e aa1233, compresi, letta in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica, della stessa proteina virale p130; ed almeno una seconda regione riproducendo almeno parte della sequenza di aminoacidi della proteina esogena; dette regioni di dette proteine ricombinanti potendo essere variamente disposte una rispetto all'altra entro ciascuna proteina ricombinante.

Preferibilmente, detta proteina esogena è CKS e dette proteine ricombinanti comprendono in dette regioni l'intera sequenza aminoacidica per ciascuna delle pp52, pp150 e p130, dette sequenze di proteine virali essendo incorporate nella CKS, in una posizione immediatamente adiacente alla posizione aa171 di

**PLEBANI Rinaldo**  
iscrizione Albo nr 358/BMI

quest'ultima.

In questo modo, un saggio Western blot perfezionato eseguito facendo uso dello strumento diagnostico secondo l'invenzione risolve tutti gli inconvenienti dei saggi noti disponibili sul mercato. Da una parte, la simultanea presenza sullo stesso mezzo di supporto solido della proteina virale pp150 e di una corrispondente proteina ricombinante di fusione, comprendente le due sequenze più immunogene della pp150 legate a una proteina-vettore, consente di superare la possibile aspecificità di un responso diretto solamente contro la banda da 150 kD. D'altra parte, la mancanza delle proteine virali non-strutturali tra quelle derivate dai virioni purificati è superata dall'inserimento nella seconda sezione dello strumento di una o più (nel caso specifico altre tre) proteine ricombinanti recanti (legati alla proteina-vettore CKS) gli epitopi immunogeni più forti di alcune delle proteine non-strutturali del virus HCMV, precisamente la sequenza H10 (aa202-aa434) della pp52 e, per ottimizzare il rilevamento delle IgM, le sequenze tra aa540 e aa601 e tra aa1144 e aa1233 di p130 (codificata da UL57).

Il fondamento della presente invenzione deve perciò essere visto nella combinazione, nello stesso strumento diagnostico, di due sezioni di bande: le bande costituenti la prima sezione sono ottenute in modo tradizionale da virioni purificati, mentre quelle costituenti la seconda sezione sono formate esclusivamente da proteine ricombinanti, le quali comprendono nella loro struttura forti determinanti antigenici di proteine virali opportunamente scelte, e ciò allo scopo di permettere un controllo incrociato tra le risposte delle due sezioni: per questa ragione, il saggio WB perfezionato secondo l'invenzione è stato chiamato "Combo-WB".

Inoltre, allo scopo di evitare risposte falsamente positive o falsamente negative, sono state inserite due bande di controllo nella sezione ricombinante. La

PLEBANI Rinaldo  
Iscrizione Albo nr 358/BM

prima è formata dalla stessa proteina usata come proteina-vettore in tutte le proteine ricombinanti di fusione del saggio, nel caso specifico la proteina CKS: una risposta positiva di questa banda indicherà la presenza nel siero esaminato di anticorpi anti-CKS e, perciò, mostrerà probabilmente un falso positivo; similmente, una risposta negativa nella banda formata dalle catene  $\mu$  mostrerà un errore nell'esecuzione del test e, pertanto, un falso negativo.

Da quanto descritto in precedenza, sebbene tale possibilità non sia stata ancora del tutto verificata sperimentalmente, appare probabile che possano essere facilmente eseguiti saggi Western blot secondo l'invenzione diretti anche all'individuazione specifica di IgG o IgA, che assicurino gli stessi eccellenti risultati del saggio per le IgM sperimentato. A questo scopo sarebbe sufficiente, ad esempio, sostituire la banda formata dalla proteina ricombinante comprendente la sequenza immunogenica di p130 con altre proteine ricombinanti, sempre fuse con la CKS, opportunamente scelte, in particolare una proteina ricombinante comprendente porzioni della proteina virale gB (espressa dal gene UL55) o della proteina virale p28 (espressa dal gene UL99); ovviamente, in questo caso le catene pesanti di classe  $\mu$  nella seconda banda di controllo verrebbero sostituite rispettivamente da catene di classe  $\gamma$  o  $\alpha$ .

Più in generale, perciò, la seconda sezione del supporto solido porta almeno una terza banda includente almeno una proteina ricombinante, la quale comprende una prima regione riproducente una sequenza di aminoacidi corrispondente ad almeno un epitopo di una seconda proteina di HCMV, strutturale o non-strutturale, e una seconda regione riproducente almeno parte della sequenza di aminoacidi della proteina esogena; detta seconda proteina virale strutturale o non-strutturale essendo selezionata in relazione alla classe di anticorpi che lo strumento

PIEBANI Rinaldo  
Iscrizione Albo nr 358/BM

diagnostico deve rivelare, precisamente IgM, IgG o IgA. In questo caso, detta seconda sezione del supporto comprende inoltre una seconda banda di controllo comprendente aliquote di catene pesanti di una classe di immunoglobuline umane opportunamente scelte nel gruppo delle catene pesanti  $\mu$ ,  $\gamma$  e  $\alpha$ .

Il mezzo di supporto solido è solitamente costituito da una striscia o da un foglio di nitrocellulosa sul quale sono riportate, tipicamente adsorbite, le proteine virali (vp) e le proteine ricombinanti (rp), secondo uno schema prefissato.

Ad esempio, tale schema potrebbe corrispondere al tipico schema di frazionamento elettroforetico in gel di poliacrilamide.

Il tipico strumento diagnostico secondo la preferita forma di attuazione dell'invenzione, specificamente destinata all'individuazione delle IgM specifiche del virus HCMV, comprende almeno le proteine virali vp150, vp82, vp65, vp38 e vp28, dette proteine virali essendo state ottenute da virioni purificati; una pluralità di proteine ricombinanti comprendenti regioni immunogene delle proteine virali pp150 e pp52 e, preferibilmente, di pp130 (o di altre proteine non strutturali ottenute per via ricombinante), dette regioni essendo incorporate in CKS; la proteina CKS, da sola; e le catene pesanti  $\mu$  delle immunoglobuline umane; tutti questi materiali proteici sono portati da un mezzo di supporto solido in nitrocellulosa, per esempio adsorbiti su di esso.

Secondo un altro aspetto dell'invenzione, essa è relativa a un metodo per l'individuazione nel siero umano delle IgM e/o IgG e/o IgA specifiche di HCMV, detto metodo comprendendo le fasi di:

- purificare virioni di HCMV e separare da detti virioni purificati almeno le proteine virali vp150, vp82, vp65, vp38 e vp28;
- ottenere, preferibilmente con tecniche di ingegneria genetica, una pluralità di

proteine ricombinanti atte ad essere espresse in un organismo ospite, dette proteine ricombinanti comprendendo regioni immunogene di proteine virali sia strutturali sia non-strutturali ed almeno una regione di una proteina esogena atta ad essere espressa in detto organismo ospite; almeno una di dette regioni immunogene delle proteine virali strutturali o non-strutturali essendo selezionata per la sua capacità di stimolare risposte immunitarie specifiche nelle IgM e/o IgG e/o IgA;

- riportare su un mezzo di supporto solido dette proteine virali e dette proteine ricombinanti, spaziate le une dalle altre e disposte secondo uno schema prefissato;

- riportare su detto mezzo di supporto solido detta proteina esogena e aliquote di catene pesanti  $\mu$  e/o  $\gamma$  e/o  $\alpha$  delle immunoglobuline umane, anch'esse spaziate le une dalle altre e da dette proteine virali e dette proteine ricombinanti;

- incubare detto mezzo di supporto solido, recante su di esso dette proteine e catene pesanti di immunoglobuline, con il siero umano da esaminare e con una sostanza rivelatrice degli anticorpi cercati (per esempio coniugati con perossidasi o altri enzimi marcati); e

- confrontare la conseguente reazione con le proteine virali e le proteine ricombinanti, considerando il test positivo solo quando reagiscono con il siero in esame simultaneamente almeno una proteina virale ed almeno una proteina ricombinante, mentre detta proteina esogena non reagisce; il test essendo ripetuto se la catena pesante di immunoglobulina non reagisce.

La presente invenzione è relativa inoltre a due plasmidi, indicati come pCMV-30 e pCMV-31, atti ad essere inseriti in un organismo ospite procariota o eucariota, e comprendenti, rispettivamente, una sequenza di DNA codificante almeno parte della sequenza tra aa540 e aa601, compresi, letta in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica, della proteina p130 del virus

**PLEBANI Rinaldo**  
iscrizione Albo nr 358/BM

HCMV, e una sequenza di DNA codificante almeno parte della sequenza tra aa1144 e aa1233, compresi, letta in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica, della stessa proteina p130. Entrambi questi plasmidi sono stati depositati presso l'American Type Culture Collection (ATCC), a Rockville, Maryland, USA, il 29 maggio 1996, secondo le modalità previste dal Trattato di Budapest, e hanno ricevuto rispettivamente i numeri di accesso ATCC 98065 e 98066. Inoltre, l'invenzione include anche ogni organismo ospite comprendente tali plasmidi.

Secondo un ulteriore aspetto dell'invenzione, essa include anche altri due plasmidi, entrambi atti ad essere inseriti in un organismo ospite procariota o eucariota; entrambi sono stati depositati presso l'ATCC il 30 aprile 1996 secondo le modalità previste dal Trattato di Budapest e sono rispettivamente indicati come pCMV-1A (numero di accesso ATCC 98042) e come pCMV-5A (numero di accesso ATCC 98044). Questi due plasmidi possono produrre le sequenze immunogeniche A1C2F3 della proteina pp150 e la sequenza H10 della proteina pp52 fusa con la CKS. Queste sequenze sono note dalla domanda di brevetto PCT numero WO-96/01321, il contenuto della quale è qui incorporato interamente per referenza. L'invenzione include anche un organismo ospite ricombinante comprendente i plasmidi pCMV-1A o pCMV-5A.

Infine, l'invenzione include materiali proteici ricombinanti, atti a legarsi con anticorpi specifici per HCMV e consistenti in proteine ricombinanti espresse in un organismo ospite in cui è stato inserito uno dei plasmidi pCMV-30, pCMV-31, pCMV-1A o pCMV-5A. In particolare, la presente invenzione include le proteine:

- [2] CKS<sub>(1-171aa)</sub>-p130<sub>(540-601aa)</sub>-T-R-CKS<sub>(171-260aa)</sub>
- [3] CKS<sub>(1-171aa)</sub>- p130<sub>(1144-1233aa)</sub>-T-R-CKS<sub>(171-260aa)</sub>

PIEBANI Rinaldo  
iscrizione Albo nr 358/BM

dove  $CKS_{(1-171aa)}$  e  $CKS_{(171-260aa)}$  rappresentano i residui della proteina CKS rispettivamente da aa1 ad aa171, compresi, letto in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica, e da aa171 ad aa260, compresi, letto in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica; T e R sono rispettivamente treonina ed arginina;  $p130_{(540-601aa)}$  rappresenta il residuo della proteina virale p130 da aa540 ad aa601, compresi, letto in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica; e  $p130_{(1144-1233aa)}$  rappresenta il residuo della stessa proteina virale p130 da aa1144 ad aa1233, compresi, letto in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica.

Sono pure coperti dalla presente invenzione i reagenti diagnostici per la diagnosi sierologica dell'infezione da HCMV e derivati dai materiali proteici ricombinanti sopra descritti ed ogni kit diagnostico per l'individuazione, con metodo sierologico, della presenza di anticorpi anti HCMV comprendente tali reagenti diagnostici.

Ulteriori caratteristiche e vantaggi della presente invenzione appariranno chiari dalla descrizione seguente di alcuni suoi esempi non limitativi di attuazione, con riferimento ai disegni annessi, nei quali:

- la figura 1 è una rappresentazione schematica della costruzione del plasmide pCMV-5A;
- la figura 2 è una rappresentazione schematica di: (A) preparazione dei frammenti PCR contenenti le sequenze di DNA  $p130_{(540-601aa)}$  e  $(p130_{(1144-1233aa)})$ ; (B) costruzione dei plasmidi pCMV-30 e pCMV-31;
- la figura 3 contiene la tabella 1, che riporta la reattività delle IgM osservata tra 500 campioni di siero di donatori di sangue;
- le figure 4a e 4b contengono la tabella 2 (che inizia nella figura 4a e continua

PLEBANI Rinaldo  
iscrizione Albo nr 358/BMI

nella figura 4b), la quale riassume l'evoluzione temporale ("follow up") di sieri prelevati da riceventi di organi trapiantati;

- la figura 5 contiene la tabella 3, che riporta la reattività al test Combo-WB di sieri umani selezionati;

- la figura 6 mostra strisce sperimentali secondo il saggio dell'invenzione; i numeri sul lato destro della figura indicano pesi molecolari apparenti di polipeptidi in condizioni denaturanti (vp = proteina virale; rp = proteina ricombinante;  $\mu$  = catena  $\mu$  purificata da immunoglobuline umane di classe M); i numeri al vertice della figura si riferiscono a differenti campioni di siero: 1-3. Donne incinte IgG/IgM-positive (EIA); 4 e 5. Riceventi di trapianto renale IgG/IgM-positivi (EIA); 6 e 7. Donne gravide IgG-positive, IgM-negative (EIA);

- la figura 7 è simile alla figura 6 e mostra: **evoluzione temporale ("follow up") di donne gravide con infezione primaria (il virus è stato trasmesso al feto):** 1. Primo campione di siero prelevato, negativo (neg.) verso le IgG e le IgM; 2. Secondo campione, IgG neg., IgM positivo (pos.); da 3. a 5. Campioni successivi prelevati a intervalli di due settimane, IgG e IgM pos.; 6. Primo campione, IgG e IgM neg.; 7. Secondo campione, IgG neg., IgM pos.; 8. Terzo campione, IgG e IgM pos.; 9. Primo campione, IgG e IgM neg.; 10-13. Campioni successivi prelevati su un periodo di 7 mesi, IgG e IgM pos.; **neonati con viruria:** 14. Campioni di siero IgG pos., IgM neg.;

- la figura 8 è una rappresentazione schematica di uno strumento diagnostico secondo l'invenzione per l'individuazione di IgM specifiche anti-HCMV.

Con riferimento alla figura 8, è indicato con 1 uno strumento diagnostico per l'individuazione di IgM specifiche anti-HCMV nel siero umano, comprendente un mezzo di supporto solido 2, ad esempio una striscia di nitrocellulosa, che porta una

pluralità di bande, ciascuna delle quali è formata da una o più proteine, disposte secondo uno schema predeterminato. In particolare, la striscia di supporto 2 comprende due sezioni 3 e 4: la prima sezione 3 porta una prima serie di bande 5a, 5b, 5c, 5d, 5e, formate da proteine virali e spaziate una dall'altra dagli intervalli  $i_1$ ,  $i_2$ ,  $i_3$ ,  $i_4$ ; la seconda sezione 4 porta una seconda serie di bande 6a, 6b, 6c, formate da proteine ricombinanti e spaziate una dall'altra dagli intervalli  $e_1$ ,  $e_2$ ; la seconda sezione 4 comprende inoltre due bande di controllo 7 e 8. Preferibilmente, le bande 5a, 5b, 5c, 5d, 5e sono rispettivamente formate dalle proteine virali di HCMV vp28, vp38, vp65, vp82 e vp150, ottenute da virioni purificati per frazionamento elettroforetico su gel di poliacrilamide e assorbite sulla striscia di supporto 2: le bande 5a, 5b, 5c, 5d, 5e risultano perciò disposte secondo il tipico schema elettroforetico, e le distanze  $i_1$ ,  $i_2$ ,  $i_3$ ,  $i_4$  tra di loro sono proporzionali alle differenze tra i rispettivi pesi molecolari. Ovviamente, le proteine virali potrebbero essere ottenute e trasferite sul supporto in modo differente, nel qual caso le distanze  $i_1$ ,  $i_2$ ,  $i_3$ ,  $i_4$  sarebbero diverse e le bande risulterebbero disposte secondo un altro schema. Le bande 6a, 6b, 6c sono formate da proteine ricombinanti ottenute, per esempio con tecniche di ingegneria genetica, incorporando nella proteina esogena CKS una o più regioni immunogene rispettivamente delle proteine virali p130, pp52 o pp150. La prima banda di controllo 7 è formata dalla proteina CKS da sola, mentre la seconda banda di controllo 8 include aliquote di catene pesanti  $\mu$  di immunoglobulina umana.

In uso, ciascuna banda di entrambe le sezioni 3 e 4 viene saggiata con il siero in esame e con una sostanza rivelatrice: dopo l'incubazione delle proteine che formano le bande con il siero, la comparsa di una macchia in corrispondenza di una banda rivela una reazione tra la proteina di quella banda e le IgM e, quindi, la

presenza di tali anticorpi nel siero esaminato. Un controllo incrociato tra le risposte delle due sezioni 3 e 4 consente di evitare possibili risultati aspecifici, come potrebbe accadere con i tradizionali test WB. Inoltre, la due bande di controllo 7 e 8 permettono di riconoscere risultati falsamente positivi o negativi: una reazione nella banda 7, formata dalla proteina CKS, indica infatti la presenza nel siero di anticorpi anti-CKS, e il test darà probabilmente un risultato falsamente positivo; se invece la banda 8, includente la catena  $\mu$ , non reagisce, si è probabilmente verificato un errore nell'esecuzione del test, ed il risultato sarà un falso negativo.

In base all'invenzione, come sarà meglio descritto nel seguito, il test è considerato positivo solo quando reagiscono simultaneamente con il siero in esame almeno una proteina virale nella prima sezione 3 e almeno una proteina ricombinante nella seconda sezione 4, mentre la proteina esogena che costituisce la prima banda di controllo 7 non reagisce e la catena pesante di immunoglobulina umana che forma la seconda banda di controllo 8 reagisce.

Il test è considerato dubbio se una o più bande della sezione ricombinante 4 risultano reattive, ma nella sezione 3 reagisce solamente la banda formata dalla proteina virale vp82.

Infine, il test deve essere ripetuto se la banda di controllo 8 non reagisce, perché in tal caso si è probabilmente verificato un errore nell'esecuzione del test (la catena  $\mu$  di immunoglobulina umana dovrebbe sempre reagire).

La presente invenzione sarà ora ulteriormente descritta per una sua migliore comprensione nei seguenti esempi non limitativi.

#### ESEMPIO 1 - Metodologia generale

##### 1. Materiali e fonti

Gli enzimi di restrizione, la Ligasi del fago T4, la fosfatasi alcalina di intestino di

vitello (CIAP), la polinucleotide chinasi e il frammento Klenow della DNA polimerasi I sono stati acquistati presso New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA, U.S.A.) oppure presso Boehringer Mannheim Corp. (Indianapolis). La DNasi I e l'aprotinina sono state acquistate presso Boehringer Mannheim Corp.

I pesi molecolari standard, sia per il DNA che per le proteine, i gel di acrilamide preformati di Daiichi e il sistema di trasferimento a semi-secco insieme ai relativi tamponi sono stati acquistati presso Integrated Separation Systems, Inc. (Natick, MA, U.S.A.).

L'isopropil- $\beta$ -tiogalattoside (IPTG), l'acrilamide, l' $N,N'$ -metilene-bis-acrilamide, l' $N,N,N',N'$ -tetrametiletilendiammina (TEMED), il 4-cloro,1-naftolo, il Blu di Coomassie<sup>TM</sup> R250, il Triton X-100<sup>TM</sup> e il sodio dodecilsolfato (SDS) sono stati acquistati presso Bio Rad Laboratories (Richmond, CA, U.S.A.).

Gli anticorpi marcati con perossidasi di rafano (HRPO) sono stati acquistati dai Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. (Gaithersburg, MD, U.S.A.). Le cellule di coli Epicurean Coli<sup>TM</sup> XL-1 Blue supercompetenti (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relE44 relA1 lac [F' proAB lacIq ZAM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]), il kit di purificazione del DNA, il kit di purificazione dell'RNA e il kit di sintesi di cDNA ZAP<sup>TM</sup>, sono stati acquistati da Stratagene Cloning Systems, Inc. (La Jolla, CA, U.S.A.).

Il kit di reagenti GeneAmp<sup>TM</sup> e la DNA polimerasi AmpliTaq<sup>TM</sup> sono stati acquistati da Perkin-Elmer Cetus (Norwalk, CT, U.S.A.). I deossinucleotidi trifosfato utilizzati nelle procedure generali sono stati presi dal kit GeneAmp<sup>TM</sup>.

La membrana di nitrocellulosa con supporto è stata acquistata da Schleicher & Schüll (Keene, NH, U.S.A.)

Il kit di nucleotidi per il sequenziamento del DNA con Sequenase<sup>TM</sup> e 7-deaza-

dGTP e la DNA polimerasi Sequenase™ versione 2.0 sono stati acquistati presso U.S. Biochemical Corp. (Cleveland, OH, U.S.A.).

Il kit di purificazione dell'mRNA poliA<sup>+</sup> è stato acquistato da Pharmacia LKB Biotechnology, Inc. (Piscataway, NJ, U.S.A.).

Le piastre di brodo Luria contenenti ampicillina (piastre LBamp) sono state acquistate presso Micro Diagnostics, Inc. (Lombard, IL, U.S.A.).

Il terreno OPTI-MEM, il siero bovino fetale, il tampone fosfato salino, le cellule di E. coli competenti DH5a (Ø-F80dlacZDM15 D(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 phoA hsdR17(rK<sup>-</sup>,mK<sup>+</sup>) supE44 1<sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1), e l'agarosio ultraPURE™ sono stati acquistati presso GIBCO BRL, Inc. (Grand Island, NY, U.S.A.).

Bacto-Tryptone, Bacto Yeast extract e Bacto-Agar sono stati acquistati presso Difco Laboratories (Detroit, MI, U.S.A.)

Il brodo NZY™ è stato comperato da Becton Dickinson Microbiology Systems (Cockeysville, MD, U.S.A.).

Il DNA di sperma di salmone, il lisozima, l'ampicillina, la N-lauroilsarcosina, il timerosal, dei tamponi, l'idrolisato acido di caseina, il TWEEN 20™ (poliossietilensorbitan monolaurato), il dietilpirocarbonato (DEPC), il fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), la sieroalbumina bovina (BSA), l'urea, il glicerolo, l'EDTA, il sodio deossicolato e sali inorganici sono stati acquistati presso Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, U.S.A.).

Il perossido d'idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) è stato acquistato presso Mallinkrodt (Paris, KY, U.S.A.) e il metanolo da EM Science (Gbbstown, N.J., U.S.A.).

## 2. Terreni, tamponi e reagenti generici

Il "SUPERBROTH II" contiene 11,25 g/l di tryptone, 22,5 g/l di estratto di lievito,

11,4 g/l di potassio fosfato dibasico, 1,7 g/l di potassio fosfato monobasico, 10 ml/l di glicerolo, un pH aggiustato a 7,2 con sodio idrossido.

Il “tampono salino Tris” o “TBS” consiste in 20mM Tris, 500mM NaCl a pH 7,5.

Il “tampono salino Tris TWEEN 20™” o “TBS-T” consiste in TBS più lo 0,05% di TWEEN 20™.

La “soluzione di bloccaggio delle membrane” consiste in Sieroalbumina bovina (BSA) all'1%, idrolisato acido di caseina all'1% e lo 0,05% di TWEEN 20™ in TBS.

Il tampono “Rubazyme di diluizione del campione” o “Rubazyme SDB” è composto da Tris 100mM a pH 7,5, NaCl 135 mM, EDTA 10mM, TWEEN 20™ allo 0,2%, timerosal allo 0,01% e siero bovino fetale al 4%.

Il tampono “Rubazyme di diluizione della coniugata” è composto da Tris 100mM a pH 7,5 con NaCl 135mM, Timerosal allo 0,01% e siero bovino fetale al 10%.

La “soluzione di sviluppo del colore HRPO” è costituita da 4-cloro-1-naftolo allo 0,06%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allo 0,02% e metanolo allo 0,2% in TBS.

Il “tampono di caricamento SDS-PAGE” è formato da Tris 62mM a pH 6,8 con SDS al 2%, glicerolo al 10%, β-mercaptoetanolo al 5% e blu di bromofenolo allo 0,1%.

Il “tampono TE” è costituito da Tris 10mM ed EDTA 1mM a pH 8,0.

Il “tampono di lisi TEM” è costituito da 50mM Tris, 10mM EDTA e MgCl<sub>2</sub> 20mM a pH 8,5.

Il “tampono PTE” è costituito da Tris 50mM e EDTA 10mM a pH 8,5.

### 3. Propagazione del virus e preparazione di cDNA

Sono stati utilizzati indifferentemente i ceppi AD169 o Towne del virus HCMV, coltivati in fibroblasti umani cresciuti in terreno OPTI-MEM™ contenente siero

bovino fetale al 5%. Il ceppo HCMV AD169 e il genoma di HCMV sono descritti nelle pubblicazioni di Chee *et al.*, *Curr. Top. Microbiol. Immuno.* 154:125 (1990) e Bankier *et al.*, *DNA Seq.* 2:1 (1991), queste informazioni essendo incorporate nel presente testo mediante referenza.

Sei (6) giorni dopo l'infezione i fibroblasti infettati con HCMV sono stati raccolti e centrifugati, lavati con PBS e omogeneizzati con un omogeneizzatore vetro-Teflon™. Il DNA virale totale è stato isolato come descritto da Mocarski *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:1266 (1985). L'RNA totale è stato isolato da cellule omogeneizzate utilizzando il kit di purificazione dell'RNA (Stratagene Cloning Systems) e l'RNA poliA<sup>+</sup> è stato isolato grazie ad un kit di purificazione degli RNA messaggeri (Pharmacia Biotech). Il cDNA di HCMV è stato sintetizzato da mRNA virale purificato mediante un kit di sintesi ZAP-cDNA™.

#### 4. Metodi generali

Tutte le digestioni enzimatiche del DNA sono state eseguite secondo le istruzioni dei produttori. Sono state utilizzate almeno 5 unità di enzima per microgrammo di DNA, e le reazioni sono state lasciate procedere per tempi di incubazione sufficienti alla completa digestione del DNA. Per l'impiego dei vari kit di manipolazione di DNA e RNA, per la sintesi di DNA con la reazione a catena della polimerasi (PCR) e per il sequenziamento del DNA sono stati seguiti i protocolli forniti dai produttori. Si sono seguite procedure standard per la preparazione su scala mini o su larga scala di DNA plasmidico da *E. coli*, per la preparazione di DNA da lisati fagici da cellule di *E. coli* infettate con fago  $\lambda$ , per la preparazione di lisati di *E. coli* per l'adsorbimento di anticorpi anti-*E. coli*, per l'estrazione con fenolo-cloroformio e la precipitazione del DNA, per le analisi di restrizione su gel di agarosio, per la purificazione di frammenti di DNA da gel di agarosio e

poliacrilamide, per il riempimento delle estremità 3' (estremità carbossiliche) incomplete del DNA, create per digestione con enzimi di restrizione, mediante il frammento Klenow della DNA polimerasi I, per la ligazione di frammenti di DNA con la ligasi del fago T4 e per la preparazione di cellule competenti TB1 (F<sup>-</sup>ara d(lac-proAB) rpsL Ø-80dlacZDM15 hsdR17) (Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989).

I frammenti di DNA per la clonazione in plasmidi generati mediante amplificazione con PCR sono stati estratti con fenolo-cloroformio e precipitati con etanolo prima di essere digeriti con enzimi di restrizione. Gli oligonucleotidi impiegati in PCR e nel sequenziamento del DNA sono stati sintetizzati in un sintetizzatore di oligonucleotidi della Applied Biosystems, modello 380B o 394, seguendo i protocolli del produttore.

#### 5. Costruzione dei vettori

La costruzione dei plasmidi precursori pJO200, pEE1, pMB34 e pROSH10 è stata descritta nella domanda di brevetto internazionale pubblicata con il No. WO96/01321 e nell'articolo di Landini *et al.* [4].

#### ESEMPIO 2 - Costruzione di pCMV-1A: CKS-A1C2F3-CKS

Il plasmide pCMV-1A, derivato dal plasmide pJO200, è stato costruito clonando un frammento di DNA contenente HCMV-A1C2F3, a sua volta ottenuto per amplificazione PCR del DNA A1C2F3 contenuto in pMB34, nel sito StuI di pJO200, come descritto nella domanda di brevetto internazionale pubblicata con il No. WO96/01321 e nell'articolo di Landini *et al.* [4]. Il plasmide pCMV-1A è stato depositato il 30 aprile 1996 presso l'ATCC secondo le modalità previste dal Trattato di Budapest e gli è stato concesso il No. di Accesso ATCC 98042.

### ESEMPIO 3 - Costruzione di pCMV-5A: CKS-H10-CKS

Il plasmide pCMV-5A, un derivato del plasmide pJO200 (Figura 1), è stato costruito clonando un frammento di DNA recante HCMV-H10, a sua volta ottenuto per amplificazione PCR del DNA H10 contenuto nel plasmide pROSH10, nel sito StuI di pJO200. Il plasmide pCMV-5A è stato depositato il 30 aprile 1996 presso l'ATCC secondo le modalità previste dal Trattato di Budapest e gli è stato concesso il No. di Accesso ATCC 98044.

La purificazione di DNA plasmidico (pROSH10 e pJO200) su vasta scala è stata eseguita con metodi generali. Il DNA del plasmide pJO200 è stato digerito con StuI e BamHI e lo scheletro del vettore purificato su gel di agarosio. La digestione StuI/BamHI ha eliminato una porzione dell'estremità 3' del gene CKS, che è stata ricostituita in seguito alla reazione di 'ligation'. Due frammenti di DNA ottenuti per amplificazione PCR sono stati clonati in questo scheletro del vettore in una reazione di 'ligation' a tre vie. H10 è stato clonato come frammento di DNA StuI/MluI e la porzione 3' rimanente del gene CKS è stata clonata come frammento di DNA MluI/BamHI ricostituendo così il gene CKS completo.

Sono stati sintetizzati un primer senso, che parte dal nucleotide 604 di ppUL44 e contiene un sito StuI, e un primer antisenso, che parte dal nucleotide 1299 di ppUL44 e contiene un sito MluI, ed aggiunti alla miscela della reazione PCR contenente il plasmide pROSH10. Successivamente all'amplificazione per PCR la miscela di reazione è stata digerita con StuI e MluI, e il frammento di DNA di 696 pb risultante e contenente H10 è stato purificato su gel di agarosio. Sono stati sintetizzati un primer senso, che parte dal nucleotide 640 di pJO200 (contenente il sito MluI) e un primer antisenso che parte dal nucleotide 905 di pJO200, e aggiunti alla miscela di reazione PCR contenente il plasmide pJO200 (le numerazioni

PLEBANI Rinaldo  
iscrizione Albo nr 358/BMJ

nucleotidiche precedenti corrispondono alla sequenza di DNA mostrata in Figura 12 per pJO200 nella domanda di brevetto internazionale pubblicata con il No. WO96/01321 da Landini *et al.*). Dopo l'amplificazione per PCR la miscela di reazione è stata digerita con MluI e BamHI, e il frammento di DNA da 266 pb risultante e contenente la porzione 3' del gene CKS è stato purificato mediante gel. Questi frammenti di DNA purificati ottenuti per PCR sono stati quindi ligati a pJO200/StuI/BamHI tutta notte a 16°C. Il giorno successivo la miscela di ligazione è stata introdotta per trasformazione in cellule competenti XL-1 Blue.

DNA su scala mini è stato poi preparato da trasformanti e analizzato per la presenza di H10 inserito al sito StuI di pJO200. Il plasmide pCMV-5A è risultato contenere H10 inserito nel sito StuI. Le sequenze del DNA di H10 e l'estremo 3' di CKS sono state confermate mediante sequenziamento di DNA. La regione codificante del costrutto CKS-H10-CKS che codifica la proteina rpCMV-5A è risultata contenere un ponte di due aminoacidi (treonina e arginina) conferito dal sito MluI tra H10 e l'estremo 3' di CKS. Inoltre l'aminoacido 171 di CKS è stato duplicato nel costrutto, il quale è stato denominato:



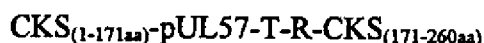
dove T e R sono, rispettivamente, i residui di treonina ed arginina, codificati dai siti di sintesi PstI e MluI introdotti nel vettore.

#### ESEMPIO 4

##### Costruzione dei vettori basati su pEE1 esprimenti CKS-pUL57-CKS

Il vettore pEE1 esprime la proteina CKS è stato utilizzato come plasmide di partenza per la costruzione di due costrutti di fusione CKS-pUL57-CKS. Per ciascun costrutto, il plasmide pEE1 è stato digerito con StuI e MluI e lo scheletro del vettore purificato. La struttura pEE1/StuI/MluI è stata in grado di accettare

frammenti del gene pUL57 generati per amplificazione PCR, i quali avevano un sito StuI alla loro estremità 5' (estremità amminica) e un sito MluI alla loro estremità 3' (estremità carbossilica). Dopo digestione con StuI e MluI, i frammenti di gene pUL57 da PCR sono stati clonati 'in-frame' nello scheletro pEE1/StuI/MluI. Le proteine di fusione CKS-pUL57-CKS espresse da questi vettori sono state denominate nel modo seguente:



dove T e R sono, rispettivamente, i residui di treonina ed arginina, codificati dai siti di sintesi PstI e MluI introdotti nel vettore.

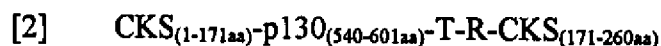
Fase 1: costruzione di pCMV-30: CKS-pUL57<sub>(540-601aa)</sub>-CKS

Il plasmide pCMV-30, un derivato del plasmide pEE1 (Figura 2A e 2B), è stato costruito clonando un frammento di DNA contenente HCMV-p130<sub>(540-601aa)</sub>, ottenuto per amplificazione con PCR di cDNA di HCMV dalla regione di pUL57 che codifica gli aminoacidi 540-601 in pEE1. Il frammento di DNA utilizzato è costituito dai nucleotidi 1618-1803 di pUL57, dove i nucleotidi 1 e 3776 corrispondono rispettivamente ai nucleotidi 90281 e 86506 del filamento complementare della sequenza pubblicata di AD169. Il plasmide pCMV-30 è stato depositato presso l'ATCC secondo le modalità previste dal Trattato di Budapest e gli è stato concesso il No. di Accesso ATCC 98065.

Utilizzando cDNA di HCMV come stampo è stato prodotto il frammento di DNA HCMV-p130<sub>(540-601aa)</sub> mediante una reazione di amplificazione con PCR in due fasi ('nested'). Per la reazione di amplificazione nested esterna sono stati sintetizzati un primer senso che parte dal nucleotide 1379 di pUL57 e un primer antisenso che parte dal nucleotide 1933 di pUL57: entrambi sono stati quindi aggiunti alla miscela contenente il cDNA. Dopo l'amplificazione con PCR la miscela

dell'amplificazione nested esterna è stata utilizzata come stampo per la reazione di amplificazione PCR nested interna. Per la reazione interna sono stati sintetizzati un primer senso che parte dal nucleotide 1618 di pUL57, contenente un sito StuI, e un primer antisenso che parte dal nucleotide 1803 di pUL57, contenente un sito PstI: entrambi sono stati poi aggiunti alla miscela contenente DNA amplificato nella reazione nested esterna. Successivamente alla reazione di amplificazione con PCR, la miscela di reazione è stata digerita con StuI e PstI, e il frammento da 186 pb contenente p130<sub>(540-601aa)</sub> è stato purificato su gel di agarosio.

Il DNA plasmidico (pEE1) è stato prodotto su larga scala con metodi generici. Il plasmide pEE1 è stato digerito con StuI e MluI e lo scheletro del vettore pEE1/StuI/MluI è stato purificato su gel di agarosio. Il frammento di DNA HCMV-p130<sub>(540-601aa)</sub> StuI/PstI purificato è stato ligato al vettore pEE1/StuI/MluI tutta notte a 16°C. Il giorno successivo la miscela di ligazione è stata inserita mediante trasformazione in cellule XL-1 Blue competenti. Dai trasformanti è stato preparato su scala mini del DNA plasmidico, che è stato quindi analizzato per la presenza dei frammenti di DNA HCMV-p130<sub>(540-601aa)</sub> inseriti nei siti StuI/MluI di pEE1: il plasmide pCMV-30 è risultato effettivamente contenere p130<sub>(540-601aa)</sub> localizzato nei siti StuI/MluI di pEE1. La sequenza del DNA di p130<sub>(540-601aa)</sub> è stata confermata inoltre mediante sequenzamento del DNA. Questo costrutto di fusione CKS-CMV-CKS è stato denominato:



dove T e R sono, rispettivamente, i residui di treonina ed arginina, codificati dai siti di sintesi PstI e MluI introdotti nel vettore.

Fase 2: costruzione di pCMV-31: CKS-pUL57<sub>(1144-1233aa)</sub>-CKS

Il plasmide pCMV-31, un derivato del plasmide pEE1 (Figura 2A e 2B), è stato

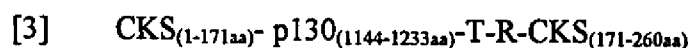
costruito clonando un frammento di DNA contenente HCMV-p130<sub>(1144-1233aa)</sub>, ottenuto per amplificazione con PCR di cDNA di HCMV dalla regione di pUL57 che codifica gli aminoacidi 1144-1233 in pEE1. Il frammento di DNA utilizzato è costituito dai nucleotidi 3430-3699 di pUL57, dove i nucleotidi 1 e 3776 corrispondono rispettivamente ai nucleotidi 90281 e 86506 del filamento complementare della sequenza pubblicata di AD169. Il plasmide pCMV-31 è stato depositato presso l'ATCC secondo le modalità previste dal Trattato di Budapest e gli è stato concesso il No. di Accesso ATCC 98066.

Utilizzando cDNA di HCMV come stampo è stato prodotto il frammento di DNA HCMV-p130<sub>(1144-1233aa)</sub> mediante una reazione di amplificazione con PCR in due fasi ('nested'). Per la reazione di amplificazione nested esterna sono stati sintetizzati un primer senso che parte dal nucleotide 3351 di pUL57 e un primer antisenso che parte dal nucleotide 3776 di pUL57: entrambi sono stati quindi aggiunti alla miscela contenente il cDNA. Dopo l'amplificazione con PCR la miscela dell'amplificazione nested esterna è stata utilizzata come stampo per la reazione di amplificazione PCR nested interna. Per la reazione interna sono stati sintetizzati un primer senso che parte dal nucleotide 3430 di pUL57, contenente un sito StuI, e un primer antisenso che parte dal nucleotide 3699 di pUL57, contenente un sito PstI: entrambi sono stati poi aggiunti alla miscela contenente DNA amplificato nella reazione nested esterna. Successivamente alla reazione di amplificazione con PCR, la miscela di reazione è stata digerita con StuI e PstI, e il frammento da 270 pb contenente p130<sub>(1144-1233aa)</sub> è stato purificato su gel di agarosio.

Il DNA plasmidico (pEE1) è stato prodotto su larga scala con metodi generici. Il plasmide pEE1 è stato digerito con StuI e MluI e lo scheletro del vettore

PLEBANI Rinaldo  
(iscrizione Albo nr 358/BMI)

pEE1/StuI/MluI è stato purificato su gel di agarosio. I frammenti di DNA HCMV-p130<sub>(1144-1233aa)</sub> PstI/MluI purificati sono stati ligati al vettore pEE1/StuI/MluI tutta notte a 16°C. Il giorno successivo la miscela di ligazione è stata inserita mediante trasformazione in cellule XL-1 Blue competenti. Dai trasformanti è stato preparato su scala mini del DNA plasmidico, che è stato quindi analizzato per la presenza dei frammenti di DNA HCMV-p130<sub>(1144-1233aa)</sub> inseriti nei siti StuI/MluI di pEE1: il plasmide pCMV-31 è risultato effettivamente contenere p130<sub>(1144-1233aa)</sub> localizzato nei siti StuI/MluI di pEE1. La sequenza del DNA di p130<sub>(1144-1233aa)</sub> è stata confermata inoltre mediante sequenziamento del DNA. Questo costrutto di fusione CKS-CMV-CKS è stato denominato:



dove T e R sono rispettivamente i residui di treonina ed arginina, codificati dai siti di sintesi PstI e MluI introdotti nel vettore.

#### ESEMPIO 5 - Produzione e purificazione di antigeni ricombinanti di HCMV

##### 1. Espressione di geni di HCMV

Il ceppo batterico di controllo che esprime la proteina CKS non fusa e tutti i cloni batterici esprimenti proteine di fusione di HCMV come dall'esempio 2 [rpCMV-1A(A1C2F3/ppUL32/pp150)], dall'esempio 3 [rpCMV-5A (H10/ppUL44/pp52)] e dall'esempio 4 [rpCMV-30(pUL57/p130) e rpCMV-31(pUL57/p130)] sono stati coltivati nel terreno "SUPERBROTH II" contenente 100 µg/ml di ampicillina fino alla fase logaritmica di crescita; la sintesi di proteine di fusione CKS-HCMV è stata indotta mediante addizione di IPTG come descritto [9]. Dopo 4 ore dall'induzione le cellule sono state raccolte per centrifugazione e i pellet sono stati congelati a -80°C fino al momento di purificare le proteine.

##### 2. Purificazione della proteina CKS non fusa e di proteine ricombinanti CKS-

## HCMV

Le proteine di fusione CKS-HCMV insolubili (rpCMV-1A, rpCMV-5A, rpCMV-30, rpCMV-31) sono state purificate dopo lisi attraverso una combinazione di lavaggi con detergente, seguiti da solubilizzazione in urea 8M [9]. La proteina CKS solubile è stata purificata dopo lisi cellulare per precipitazione con ammonio solfato seguita da cromatografia DEAE.

### ESEMPIO 6 - Prove sperimentali "Combo-WB"

#### 1. Campioni di siero umano

Cinquecento campioni di siero di donatori di sangue, selezionati casualmente tra una collezione di sieri, sono stati saggiati per valutare il grado di specificità del Combo-WB in confronto al tradizionale EIA, con particolare attenzione ai falsi positivi.

Per valutare la sensibilità del test Combo-WB, sono stati scelti 100 sieri tra i campioni risultati positivi alle IgM anti-CMV come determinato con differenti procedure, precisamente due test EIA commerciali e il tradizionale test WB. Sono stati inseriti in questo gruppo e utilizzati successivamente solo campioni risultati positivi in tutti e tre i test. Per valutare ulteriormente la sensibilità del test sono stati selezionati altri due gruppi di campioni: 85 sieri prelevati da riceventi di trapianto di cuore (HTR) con una PCR positiva per HCMV in polimorfonucleociti (PMNL), e 38 sieri di donne in gravidanza con infezione da HCMV, dimostrata per isolamento del virus dalle urine o per sieroconversione delle IgG.

Inoltre, allo scopo di determinare il tempo di comparsa e l'evoluzione della risposta immunitaria al virus HCMV come rilevato dal test Combo-WB, è stata condotta una indagine temporale ("follow up") su 10 riceventi da trapianto, dai quali sono

stati prelevati un totale di 74 campioni di sangue che sono stati analizzati sia per antigenemia sia per la ricerca di IgM specifiche anti-CMV con il convenzionale EIA e con il Combo-WB.

## 2. Diagnostica virologica dell'infezione da parte del virus HCMV

### 2.1- Isolamento del virus

Per isolare il virus dalle urine e dalla saliva è stata usata la procedura "shell vial" [1]. Le cellule fibroblastoidi umane inoculate con il materiale patologico sono state fissate 24-48 ore dopo l'inoculazione e colorate mediante immunofluorescenza indiretta (IIF) usando un anticorpo monoclonale che reagisce con il prodotto genico HCMV-IE1/IE2 (E13 della Bioline, Parigi, Francia).

### 2.2- Antigenemia

La presenza di HCMV-pp65 in una frazione PBL arricchita in PMNL è stata determinata come originalmente descritto da *van der Bijl et al.* [10] e modificato da *Revello et al.* [8] usando un anticorpo specifico monoclonale HCMV-pp65 (clone 1C3 da Argene, Parigi, Francia) in test IIF indiretti.

I risultati venivano quantificati al microscopio a fluorescenza contando il numero di cellule pp65-positive tra 200.000. Una cellula positiva su 200.000 era sufficiente a definire un risultato positivo per antigenemia.

## 3. Diagnostica sierologica di infezione da parte del virus HCMV

### 3.1- Test EIA convenzionali

La titolazione delle IgG specifiche contro il virus HCMV è stata condotta utilizzando un kit Enzygnost anti-CMV/IgG EIA alpha method (Behring AG, Marburg, Germania) disponibile sul mercato. Le micro-piastre sono state lette con un micro-lettore automatico per EIA (Behring AG). La valutazione delle IgM anti-CMV è stata eseguita usando il kit Enzygnost anti-CMV/IgM (Behring AG). I

risultati sono stati interpretati secondo le indicazioni fornite dai produttori.

### 3.2- Test "Combo-WB" per l'individuazione di IgM anti-CMV

Utilizzando la tradizionale tecnica WB, come già descritto [3], sono stati frazionati su gel di poliacrilamide lisati di virioni purificati: i polipeptidi così separati sono stati quindi trasferiti su fogli di nitrocellulosa, a seconda dei loro profili elettroforetici. I fogli di nitrocellulosa eccedevano di circa un quarto la dimensione in lunghezza dei gel in modo da lasciare abbastanza spazio al loro fondo per le proteine ricombinanti. Dopo il trasferimento elettroforetico delle proteine virali ogni blot è stato montato su un miniblatter in modo che i canali del miniblatter risultassero orientati perpendicolarmente alla direzione di migrazione delle proteine sul gel di poliacrilamide; sospensioni delle tre proteine ricombinanti sono state depositate nel pozzetto. Per controllare le reazioni non specifiche verso la proteina-vettore e la corretta individuazione del complesso immune, sono stati inclusi due canali di controllo nei quali sono state depositate rispettivamente una sospensione della proteina-vettore CKS e una della catena  $\mu$  di immunoglobulina umana. I miniblatter sono stati poi tenuti in leggera agitazione su una piattaforma oscillante per una notte a 4°C. I filtri sono stati lavati brevemente in TBS, poi saturati per incubazione con una soluzione di blocking (3% gelatina di pesce, 1% BSA, 5% latte scremato in polvere, 0,05% Tween 20 in TBS) a temperatura ambiente per un'ora. I filtri sono stati quindi tagliati in strisce di tre millimetri di larghezza, ciascuna recante sia autentiche proteine virali (nella parte superiore) sia polipeptidi ricombinanti (nella porzione inferiore), e risultando quindi costituita da una combinazione di una tradizionale sezione WB e da una sezione di bande ricombinanti. Le strisce di nitrocellulosa sopra descritte sono state usate in analisi sierologiche per la ricerca di IgM specifiche per HCMV nel siero umano. I sieri

sono stati diluiti 1:50 in TBS in presenza del 4% di siero bovino fetale (SBF), 0,1% Tween 20. Gli anticorpi anti catena  $\mu$  umana, coniugati con perossidasi (IgM anti-umane di capra), sono stati diluiti in TBS contenente il 10% di SBF.

### 3.3- Algoritmo per l'interpretazione del saggio Combo-WB per l'individuazione di IgM

La sezione WB della striscia con le proteine virali è stata considerata positiva solo quando è stata trovata reattiva verso il siero umano una delle seguenti proteine: pp150, pp65, p55, p38, p28. La sezione ricombinante della striscia è stata considerata positiva quando è stata trovata reattiva almeno una delle bande corrispondenti alle proteine virali ricombinanti. Il saggio è stato considerato:

- positivo quando almeno una banda reattiva della sezione WB tradizionale della striscia è stata confermata dalla reattività di almeno una banda della sezione ricombinante;

- negativo se una delle due sezioni della striscia è stata completamente negativa, indipendentemente da quante bande siano risultate reattive nell'altra sezione;

- indeterminato o equivoco se alla positività di una o più bande della sezione ricombinante ha corrisposto la sola positività della p82 nella sezione WB della striscia.

Una reazione positiva nella posizione della catena  $\mu$  e nessuna reazione nella posizione della proteina-vettore erano necessarie per confermare la validità del saggio.

### 3.4- Combo-WB per l'individuazione di IgG o IgA anti-HCMV

Strisce Combo-WB preparate come descritto sopra possono essere usate anche in saggi sierologici per la ricerca nel siero umano di IgG e IgA specifiche contro il virus HCMV. I sieri vengono diluiti 1:100 in TBS in presenza del 4% di SBF e

dello 0,1% di Tween 20. Gli anticorpi specifici per la catena  $\gamma$  e  $\alpha$  rispettivamente, coniugati con perossidasi (IgM anti-umane di capra), vengono diluiti in TBS contenente il 10% di SBF.

#### 4. Risultati

##### 4.1- Individuazione di IgM specifiche anti-HCMV con il saggio Combo-WB

Per verificare la specificità del test Combo-WB verso le IgM specifiche per HCMV è stato esaminato un elevato numero di campioni provenienti da donatori di sangue e individui sani, in parallelo ad un tradizionale test EIA. È stato analizzato un totale di 500 sieri, 300 raccolti negli Stati Uniti e 200 in Italia. Il 79% dei sieri è stato trovato positivo per le IgG. Lo 0,2% dei campioni di siero è stato trovato positivo verso le IgM dal test EIA tradizionale e l'1,8% dal metodo combinato. I dettagli di questa analisi sono riassunti in tabella 1: 14 sieri (2,8%) hanno reagito con la sola vp150, 3 sieri (0,6%) hanno reagito con la sola vp82 e pochi altri sieri (non più dello 0,4%) hanno reagito solo con una o più altre proteine virali, ma nessuno di questi ha dato reazioni con le proteine ricombinanti; tre sieri (0,6%) hanno reagito solo con una o più proteine ricombinanti, senza dare reazione concomitante con alcuna proteina virale: entrambi questi due gruppi di sieri sono stati considerati negativi alle IgM. 9 sieri (1,8%) hanno reagito con almeno una proteina virale e una ricombinante e sono stati pertanto considerati positivi alle IgM.

Inoltre, allo scopo di determinare la sensibilità verso le IgM del saggio secondo l'invenzione, sono stati analizzati con il Combo-WB altri 100 sieri che erano stati trovati positivi per le IgM specifiche per HCMV sia in test commerciali EIA sia nel WB tradizionale: il 100% di tali sieri è stato trovato positivo anche con il test Combo-WB. Per valutare ulteriormente la sensibilità del saggio, sono stati saggiati altri due gruppi di sieri. Un primo gruppo consistente di 85 campioni prelevati da

pazienti trapiantati di cuore, che erano stati trovati con PCR positiva per il virus HCMV in PMNL, è stato analizzato per la presenza di IgM specifiche per HCMV con un kit EIA commerciale e con il Combo-WB: 39 sono stati trovati positivi dal kit commerciale mentre 58 sono stati trovati positivi dal Combo-WB (tabella 3). Infine, 38 campioni di siero ottenuti da donne gravide sono stati selezionati in base alla presenza di un'infezione attiva al tempo della raccolta. Quando questi campioni sono stati analizzati per la presenza di IgM anti-HCMV con il test EIA e il test Combo-WB, 22 sono stati trovati positivi dalla prima tecnica e 34 dalla seconda (vedi tabella 3). Alcuni esempi di reattività dei campioni di siero con il test Combo-WB sono mostrati nelle figure 6 e 7. I sieri erano stati prelevati da donne in gravidanza con infezione acuta (figura 6, righe da 1 a 3), infezione pregressa (figura 6, righe 6 e 7) e infezione primaria con documentata trasmissione del virus al feto (figura 7).

Allo scopo di stabilire il tempo di comparsa e l'evoluzione della risposta immunitaria delle IgM come rilevato dal Combo-WB nel caso di infezione acuta, è stato incluso nell'analisi sperimentale un ulteriore gruppo di dieci riceventi di trapianto d'organo, ed è stata condotta un'indagine temporale ("follow up") sui campioni di siero prelevati da essi (complessivamente 74): il primo campione è stato prelevato da ciascun ricevente prima dell'intervento chirurgico, i successivi sono stati prelevati periodicamente, con intervalli compresi tra 2 e 78 giorni; i sieri sono stati quindi sottoposti in parallelo a un test di Antigenemia, a un test commerciale EIA per le IgM e al Combo-WB. Come mostrato in tabella 2, in quattro casi i tre metodi hanno mostrato una sensibilità confrontabile e tutti i saggi sono stati giudicati positivi per la prima volta nello stesso campione (Arq, Fir, Fer e Bat). In due casi (Fio e Bos) il test Antigenemia è stato il primo a rivelare la

riattivazione dell'infezione, rispettivamente con 14 e con 9 giorni di anticipo; in un caso (Cup) il Combo-WB è stato il primo, con 19 giorni di anticipo rispetto a Antigenemia; in un caso (Sab) Antigenemia e Combo-WB hanno preceduto EIA di una settimana. Un esempio della reattività di questi sieri nel test Combo-WB è illustrato in figura 6, righe 4 e 5.

Se si considera la sola analisi sierologia delle IgM anti-CMV, il Combo-WB ha preceduto il test EIA in due casi (Sab, Cup), in altri due casi si è verificato il contrario (Fio e Cic), mentre nei rimanenti sei casi EIA e Combo-WB sono stati trovati positivi allo stesso tempo.

#### 4.2- Individuazione di IgG e IgA anti-HCMV con il saggio Combo-WB

Una versione modificata del saggio Combo-WB è applicabile a campioni di siero umano per l'individuazione di IgG e IgA specifiche per HCMV. Fondamentalmente le strisce di nitrocellulosa vengono preparate nello stesso modo di quello usato per la ricerca specifica di IgM, eccetto che invece della proteina ricombinante esprime parte di pUL57, vengono usate proteine ricombinanti esprimenti porzioni di gB (UL55) e p28 (UL99).

#### 5. Discussione

È stato messo a punto un nuovo test sierologico basato sulla nota tecnica WB: questo nuovo test utilizza come materiale antigenico sia proteine virali native, sia immunogeni ricombinanti.

Per realizzare un prodotto diagnostico avente sia la spiccata specificità di un autentico materiale virale sia l'affidabilità di un antigene prodotto per ricombinazione, infatti, sono stati combinati prodotti virali originati da cellule infette e antigeni ricombinanti ottenuti con tecniche di ingegneria genetica. Lo scopo della presente invenzione era infatti fornire un materiale antigenico per

HCMV commercialmente disponibile con uno standard interno in grado di confermare i risultati indeterminati, e allo stesso tempo arricchire con antigeni virali non-strutturali l'assortimento di bersagli virali riconoscibili da anticorpi specifici. Un ulteriore scopo della presente invenzione era integrare una definita miscela di antigeni ricombinanti di HCMV con prodotti virali strutturali autentici, in modo da garantire un riferimento interno per la reattività del siero umano verso le proteine ricombinanti. In realtà il fondamento per l'interpretazione dei risultati è una conseguenza diretta di questo controllo interno reciproco costituente il saggio stesso: perciò il test è considerato positivo solo quando positività è presente in almeno una banda significativa di entrambe le parti del saggio.

I risultati sperimentali mostrano che il saggio Combo-WB secondo l'invenzione è:

- 1) più sensibile dei tradizionali test EIA (Behring),
- 2) più specifico del tradizionale test WB.

Infatti, essendo documentato che risulta positiva alle IgM per HCMV una media tra lo 0,3% e l'1% dei campioni di siero prelevati statisticamente in una popolazione di donatori di sangue o adulti sani [7], i risultati sperimentali mostrano che il Combo-WB garantisce una più elevata specificità rispetto al tradizionale WB.

#### RIFERIMENTI

- [1] Gleaves, C. A., T. F. Smith, E. A. Shuster, and G. R. Pearson. 1984. Rapid detection of cytomegalovirus in MRC5 cells inoculated with urine specimens by use of low speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *Journal of Clinical Microbiology*. 19:917-919.
- [2] Ho, M. 1991. *Cytomegalovirus: Biology and Infection*, 2nd Edition. Plenum Publishing Corp., New York.

- [3] Landini, M. P., B. Baldassarri, G. Mirolo, A. Ripalti, and M. La Placa. 1988. Reactivity of cytomegalovirus structural polypeptides with different subclasses of IgG present in human serum. *J. Infect.* 16(2):163-7.
- [4] Landini, M. P., T. Lazzarotto, G. T. Maine, and R. Flanders. 1995. Recombinant mono- and Polyantigens to detect cytomegalovirus-specific immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 33(10):2535-42.
- [5] Landini, M. P., M. C. Re, G. Mirolo, B. Baldassarri, and M. La Placa. 1985. Human immune response to cytomegalovirus structural polypeptides studied by immunoblotting. *J. Med. Virol.* 17:303-311.
- [6] Lazzarotto, T., B. Dalla Casa, B. Campisi, and M. P. Landini. 1992. Enzyme-linked immunoadsorbent assay for the detection of cytomegalovirus-IgM: comparison between eight commercial kits, immunofluorescence and immunoblotting. *J. Clin. Lab. Anal.* 6:216-218.
- [7] Nielsen, C. M., K. Hansen, H. M. Andersen, J. Gerstoft, and B. F. Vestergaard. 1987. An enzyme labelled nuclear antigen immunoassay for detection of cytomegalovirus IgM antibodies in human serum: specific and non-specific reactions. *J. Med. Virol.* 22(1):67-76.
- [8] Revello, M. G., M. Zavattoni, E. Percivalle, P. Grossi, and G. Gerna. 1989. Correlation between immunofluorescent detection of human cytomegalovirus immediate early antigens in polymorphonuclear leukocytes and viremia. *J. Infect. Disease.* 160:159-160.
- [9] Robinson, J. M., T. J. Pilot-Matias, S. D. Pratt, C. B. Patel, T. S. Bevirt, J. C. Hunt. 1993. Analysis of the humoral response to the flagellin protein of *Borrelia burgdorferi*: cloning regions capable of differentiating lyme disease from syphilis. *J.*

Clin. Micro. 31:629-635.

[10] van der Bijl, W., J. R. Torensma, J. Son W, J. Schirm, Tegzess, A, M, and T. The, H. 1988. Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leukocytes. J. Med. Virol. 25:179-188.

[11] Lazzarotto, T., G.T. Maine, P. Dal Monte, H. Frush, K. Shi and M.P. Landini. 1996. The detection of serum IgM to human cytomegalovirus by viral western blot correlates better with virological data than serum IgM detected by conventional enzyme immunoassay. J. Clin. Lab. Anal. (in stampa).

[12] Maine, G.T., T. Lazzarotto, L.E. Chovan, R. Flanders and M.P. Landini. 1996. The DNA-binding protein pUL57 of human cytomegalovirus: comparison of specific IgM reactivity with IgM reactivity to other major target antigens. J. Clin. Lab. Anal. (in stampa).

**PLEBANI Rinaldo**  
(iscrizione Albo nr 358/BMI)

## RIVENDICAZIONI

1. Strumento diagnostico per l'individuazione di anticorpi anti-HCMV nel siero umano, detto strumento diagnostico comprendendo un mezzo di supporto solido, una prima sezione del quale porta una pluralità di proteine virali (vp) ottenute da virioni purificati, dette proteine virali essendo concentrate in rispettive bande e le bande essendo portate da detta prima sezione del supporto solido spaziate una dall'altra secondo uno schema prefissato; una di dette bande essendo formata da almeno una proteina virale di circa 150 kD di peso molecolare; detto strumento diagnostico essendo caratterizzato dal fatto che:

(i) - detto mezzo di supporto solido comprende inoltre una seconda sezione recante una pluralità di bande spaziate tra loro secondo uno schema prefissato, almeno una prima banda di detta seconda sezione includendo una proteina ricombinante (rp) la quale comprende una prima regione riprodotte una sequenza di aminoacidi corrispondente ad almeno un epitopo della proteina virale pp150, e una seconda regione riprodotte almeno parte della sequenza di aminoacidi di una proteina esogena, che possa essere espressa in un organismo ospite procariota o eucariota;

(ii) - almeno una seconda banda della seconda sezione includendo una proteina ricombinante la quale comprende una prima regione riprodotte una sequenza di aminoacidi corrispondente ad almeno un epitopo immunogenico di una prima proteina non-strutturale del virus HCMV, e una seconda regione riprodotte almeno parte della sequenza di aminoacidi di detta proteina esogena; e

(iii) - almeno una banda di controllo formata da detta proteina esogena.

2. Strumento diagnostico secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detta proteina ricombinante inclusa in detta prima banda della seconda sezione

**PLEBANI Rinaldo**  
(iscrizione Albo nr 358/BM)

comprende detta prima regione, la quale riproduce una sequenza di aminoacidi (F3) corrispondente ad almeno parte della sequenza tra aa1006 e aa1048, compresi, letta in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica, della proteina virale pp150; e una terza regione, riproducete una sequenza di aminoacidi (A1C2) corrispondente ad almeno parte della sequenza tra aa595 e aa614, compresi, letta in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica, della stessa proteina virale pp150; dette regioni potendo essere variamente disposte una rispetto all'altra entro detta prima proteina ricombinante.

3. Strumento diagnostico secondo la rivendicazione 1 o 2, caratterizzato dal fatto che detta seconda banda della seconda sezione include una proteina ricombinante, la detta prima regione della quale riproduce una sequenza di aminoacidi (H10) corrispondente ad almeno parte della sequenza tra aa202 e aa434, compresi, letta in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica, della proteina virale pp52.

4. Strumento diagnostico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che detta seconda sezione di detto mezzo di supporto solido porta almeno una terza banda includente almeno una proteina ricombinante, la quale comprende una prima regione riproducete una sequenza di aminoacidi corrispondente ad almeno un epitopo di una seconda proteina di HCMV, strutturale o non-strutturale, e una seconda regione riproducete almeno parte della sequenza di aminoacidi di detta proteina esogena; detta seconda proteina virale strutturale o non-strutturale essendo selezionata in relazione alla classe di anticorpi da rivelare con detto strumento diagnostico, in particolare IgM, IgG o IgA.

5. Strumento diagnostico secondo la rivendicazione 4, caratterizzato dal fatto

che detta seconda sezione di detto mezzo di supporto solido comprende una seconda banda di controllo, comprendente a sua volta aliquote di catene pesanti di una classe di immunoglobuline; detta classe essendo selezionata nel gruppo delle catene pesanti  $\mu$ ,  $\gamma$  e  $\alpha$  in relazione alla classe di anticorpi che devono essere rilevati da detto strumento diagnostico, in particolare IgM, IgG o IgA.

6. Strumento diagnostico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in particolare per l'individuazione di IgM anti-HCMV, caratterizzato dal fatto che detta seconda sezione di detto mezzo di supporto solido comprende:

(i) - una seconda banda di controllo comprendente aliquote di catene pesanti  $\mu$ ;

(ii) - una prima proteina ricombinante, la quale comprende una prima regione riprodotte una sequenza di aminoacidi corrispondente ad almeno parte della sequenza tra aa540 e aa601, compresi, letta in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica, della proteina virale p130; ed almeno una seconda regione riprodotte almeno parte della sequenza di aminoacidi di detta proteina esogena;

(iii) - una seconda proteina ricombinante, la quale comprende una prima regione, riprodotte una sequenza di aminoacidi corrispondente ad almeno parte della sequenza tra aa1144 e aa1233, compresi, letta in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica, della stessa proteina virale p130; ed almeno una seconda regione riprodotte almeno parte della sequenza di aminoacidi di detta proteina esogena;

dette prima e seconda proteine ricombinanti essendo disposte in almeno una banda, e dette regioni di dette proteine ricombinanti potendo essere variamente disposte una rispetto all'altra entro ciascuna proteina ricombinante.

7. Strumento diagnostico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni

precedenti, caratterizzato dal fatto che detta proteina esogena è CKS.

8. Strumento diagnostico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che dette proteine ricombinanti comprendono in dette regioni l'intera sequenza di aminoacidi per ciascuna delle pp52, pp150, e p130, dette sequenze di proteine virali essendo incorporate nella sequenza della CKS, in una posizione immediatamente adiacente alla posizione aa171 di quest'ultima.

9. Strumento diagnostico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che detto mezzo di supporto solido è una striscia o un foglio di nitrocellulosa sul quale sono riportate, secondo uno schema prefissato, dette proteine virali (vp) e dette proteine ricombinanti (rp).

10. Strumento diagnostico secondo la rivendicazione precedente, caratterizzato dal fatto che detto schema prefissato sia delle proteine virali (vp) sia delle proteine ricombinanti (rp) corrisponde al tipico schema di frazionamento elettroforetico in gel di poliacrilamide.

11. Strumento diagnostico per l'individuazione di IgM dirette anti-HCMV nel siero umano, caratterizzato dal fatto di comprendere in combinazione aliquote di:

- proteine virali vp150, vp82, vp65, vp38 e vp28, dette proteine virali essendo ottenute da virioni purificati;
- una pluralità di proteine ricombinanti comprendenti regioni immunogeniche delle proteine virali pp150, pp52 e p130, dette regioni essendo incorporate in CKS;
- la proteina CKS, da sola; e
- la catena pesante  $\mu$  dell'immunoglobulina umana;

dette aliquote di detto materiale proteico essendo portate da un mezzo di supporto solido, preferibilmente adsorbite su di esso.

12. Saggio Western blot perfezionato per l'individuazione di anticorpi specifici anti-HCMV nel siero umano, caratterizzato dal fatto di comprendere uno strumento diagnostico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti.

13. Metodo per l'individuazione nel siero umano di IgM e/o IgG e/o IgA anti-HCMV, caratterizzato dal fatto di comprendere le fasi di:

- purificare i virioni di HCMV e separare da detti virioni purificati almeno le proteine virali vp150, vp82, vp65, vp38 e vp28;

- ottenere una pluralità di proteine ricombinanti atte ad essere espresse in un organismo ospite, dette proteine ricombinanti comprendendo regioni immunogene di proteine virali sia strutturali sia non-strutturali e almeno una regione di una proteina esogena atta ad essere espressa in detto organismo ospite; almeno una di dette regioni immunogene di dette proteine virali strutturali o non-strutturali essendo selezionata per la sua capacità di stimolare risposte immunitarie specifiche in IgM e/o IgG e/o IgA;

- riportare su un mezzo di supporto solido dette proteine virali e dette proteine ricombinanti, spaziate le une dalle altre e disposte secondo uno schema prefissato;

- riportare su detto mezzo di supporto solido detta proteina esogena e aliquote di catene pesanti  $\mu$  e/o  $\gamma$  e/o  $\alpha$  di immunoglobuline umane, anch'esse spaziate le une dalle altre e da dette proteine virali e da dette proteine ricombinanti;

- incubare detto mezzo di supporto solido, recante su di esso dette proteine e catene pesanti di immunoglobuline, con il siero umano da analizzare e con una sostanza rivelatrice degli anticorpi cercati; e

- confrontare la conseguente reazione con le proteine virali e con le proteine ricombinanti, considerando il test positivo solo quando reagiscono con il siero in esame simultaneamente almeno una proteina virale ed almeno una proteina

PLEBANI Rinaldo  
iscrizione Albo nr 358/BM

ricombinante, mentre detta proteina esogena non reagisce; il test essendo ripetuto se la catena pesante dell'immunoglobulina umana non reagisce.

14. Plasmide, atto ad essere inserito in un organismo ospite procariota o eucariota, caratterizzato dal fatto di comprendere una sequenza di DNA codificante almeno parte della sequenza tra aa540 e aa601, compresi, letta in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica, della proteina p130 del virus HCMV.

15. Plasmide secondo la rivendicazione 14, caratterizzato dal fatto di possedere le caratteristiche del plasmide pCMV-30 depositato presso l'ATCC e avente il numero di accesso ATCC 98065.

16. Organismo ospite comprendente un plasmide secondo la rivendicazione 14 o 15, atto a produrre una proteina ricombinante comprendente una prima regione, riprodotte una sequenza di aminoacidi corrispondente ad almeno parte della sequenza tra aa540 e aa601, compresi, letta in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica, della proteina virale p130; e almeno una seconda regione riprodotte almeno parte della sequenza di aminoacidi della proteina CKS; dette regioni potendo essere variamente disposte una rispetto all'altra entro detta proteina ricombinante.

17. Plasmide, atto ad essere inserito in un organismo ospite procariota o eucariota, caratterizzato dal fatto di comprendere una sequenza di DNA codificante almeno parte della sequenza tra aa1144 e aa1233, compresi, letta in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica, della proteina p130 del virus HCMV.

18. Plasmide secondo la rivendicazione 17, caratterizzato dal fatto di possedere le caratteristiche del plasmide pCMV-31 depositato presso l'ATCC e avente il

numero di accesso ATCC 98066.

19. Organismo ospite comprendente un plasmide secondo la rivendicazione 17 o 18, atto a produrre una proteina ricombinante comprendente una prima regione, riprodotte una sequenza di aminoacidi corrispondente ad almeno parte della sequenza tra aa1144 e aa1233, compresi, letta in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica, della proteina p130 del virus HCMV; e almeno una seconda regione riprodotte almeno parte della sequenza di aminoacidi della proteina CKS; dette regioni potendo essere variamente disposte una rispetto all'altra entro detta proteina ricombinante.

20. Plasmide atto ad essere inserito in un organismo ospite procariota o eucariota, caratterizzato dal fatto di avere le caratteristiche del plasmide pCMV-1A depositato presso l'ATCC e avente il numero di accesso ATCC 98042.

21. Plasmide atto ad essere inserito in un organismo ospite procariota o eucariota, caratterizzato dal fatto di avere le caratteristiche del plasmide pCMV-5A depositato presso l'ATCC e avente il numero di accesso ATCC 98044.

22. Organismo ospite caratterizzato dal fatto di comprendere un plasmide secondo la rivendicazione 20 o 21.

23. Materiale proteico ricombinante, atto a legarsi con anticorpi anti-HCMV, caratterizzato dal fatto che consiste in una proteina ricombinante espressa in un organismo ospite in cui è stato inserito il plasmide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 14, 15, 17, 18, 20 o 21.

24. Materiale proteico ricombinante, atto a legarsi con le IgM anti-HCMV, caratterizzato dal fatto di comprendere almeno una delle due proteine ricombinanti seguenti:

[2] CKS<sub>(1-171aa)</sub>-p130<sub>(540-601aa)</sub>-T-R-CKS<sub>(171-260aa)</sub>

[3] CKS<sub>(1-171aa)</sub>-p130<sub>(1144-1233aa)</sub>-T-R-CKS<sub>(171-260aa)</sub>

dove CKS<sub>(1-171aa)</sub> e CKS<sub>(171-260aa)</sub> rappresentano i residui della proteina CKS rispettivamente da aa1 ad aa171, compresi, letto in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica, e da aa171 ad aa260, compresi, letto in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica; T e R sono rispettivamente treonina ed arginina; p130<sub>(540-601aa)</sub> rappresenta il residuo della proteina virale p130 da aa540 ad aa601, compresi, letto in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica; e p130<sub>(1144-1233aa)</sub> rappresenta il residuo della stessa proteina virale p130 da aa1144 ad aa1233, compresi, letto in direzione dall'estremità amminica all'estremità carbossilica.

25. Reagente diagnostico per la diagnosi sierologica dell'infezione da HCMV, caratterizzato dal fatto di comprendere un materiale proteico ricombinante secondo una delle rivendicazioni 23 o 24.

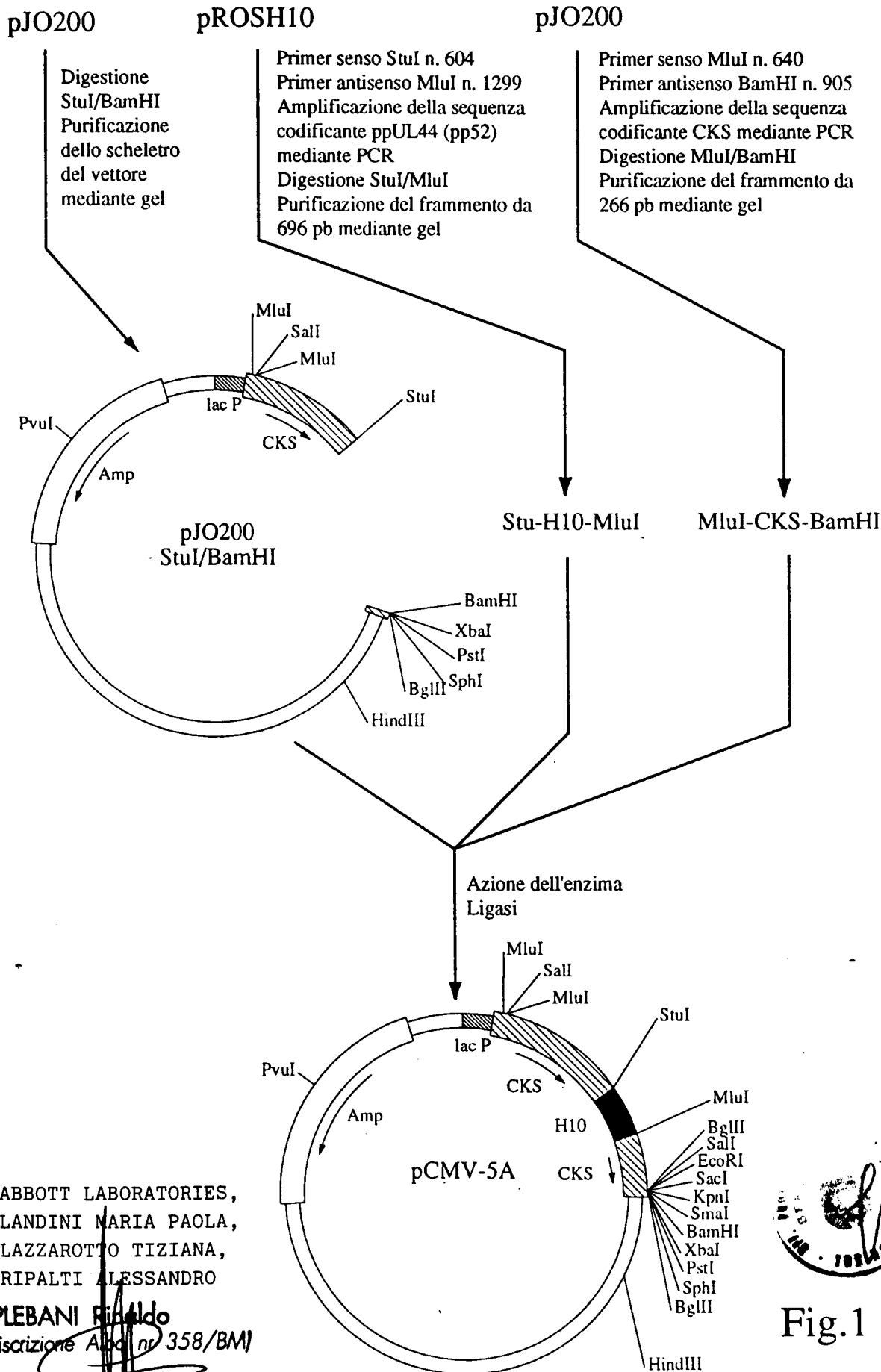
26. Kit diagnostico per la determinazione, per via sierologica, della presenza di anticorpi anti-HCMV, caratterizzato dal fatto di comprendere almeno un reagente diagnostico secondo la rivendicazione 25.

p.i.: (1) ABBOTT LABORATORIES, (2) LANDINI MARIA PAOLA,  
(3) LAZZAROTTO TIZIANA, (4) RIPALTI ALESSANDRO

PLEBANI Rinaldo  
(iscrizione Albo nr 358/BM)



PLEBANI Rinaldo  
(iscrizione Albo nr 358/BM)



- p.i.: 1) ABBOTT LABORATORIES,  
 2) LANDINI MARIA PAOLA,  
 3) LAZZAROTTO TIZIANA,  
 4) RIPALTI ALESSANDRO

**PLEBANI Riccardo**  
 (iscrizione Albo nr 358/BM)



Fig.1

HCMV cDNA

Primer senso n. 1379  
Primer antisenso n. 1933  
Amplificazione di sequenze  
codificanti pUL57 (p130)  
mediante PCR

Primer senso n. 3351  
Primer antisenso n. 3776  
Amplificazione di sequenze  
codificanti pUL57 (p130)  
mediante PCR

Reazione PCR "nest" esterna

Reazione PCR "nest" esterna

Primer senso StuI n. 1618  
Primer antisenso MluI n. 1803  
Amplificazione mediante  
PCR "Nest" interna di sequenze  
codificanti pUL57 (p130)  
Digestione StuI/MluI  
Purificazione del frammento  
da 186 pb mediante gel

Primer senso StuI n. 3430  
Primer antisenso MluI n. 3699  
Amplificazione mediante  
PCR "Nest" interna di sequenze  
codificanti pUL57 (p130)  
Digestione StuI/MluI  
Purificazione del frammento  
da 270 pb mediante gel

StuI-p130(540-601aa)-MluI

StuI-p130(1144-1233aa)-MluI

p.i.: 1) ABBOTT LABORATORIES, 2) LANDINI MARIA PAOLA,  
3) LAZZAROTTO TIZIANA, 4) RIPALTI ALESSANDRO

**PLEBANI Rinaldo**  
(iscrizione n. 358/BM)

Fig.2A



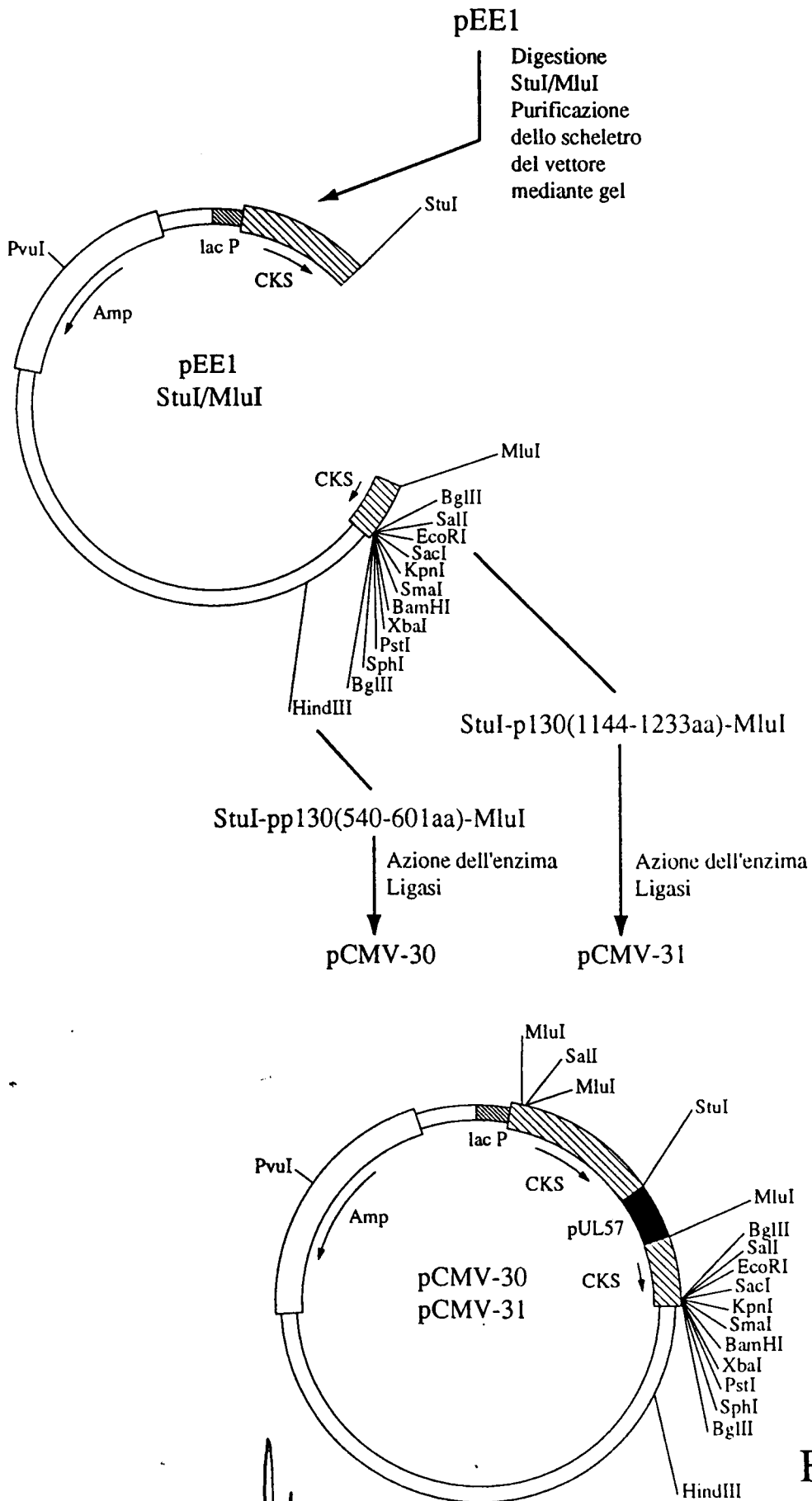


Fig.2B

p.i.: 1) ABBOTT LABORATORIES 2) LANDINI MARIA PAOLA, 3) LAZZAROTTO TIZIANA, 4) RIPALTI ALESSANDRO

**PIEBANI Rinaldo**  
Istruzione Albo n° 358/BM

Tabella 1

COMBINAZIONI DI PROTEINE REATTIVE CON IGM IN SIERI DA DONATORI DI SANGUE		N. DI SIERI CON REAZIONE POSITIVA		
		DAGLI U.S.A. n = 300	DALL'ITALIA n = 200	TOT. n (%)
PROTEINE VIRALI	PROTEINE RICOMBINANTI			
vp150		3	11	14 (2.8)
vp82			3	3 (0.6)
vp38			2	2 (0.4)
vp150, vp38			2	2 (0.4)
vp150, vp82		1	1	2 (0.4)
vp150, vp65		1		1 (0.2)
vp150, vp38, vp28		1		1 (0.2)
	rp150	2	1	3 (0.6)
	rp52	3		3 (0.6)
	rp150, rp52, rp130	3		3 (0.6)
	rp150, rp130		2	2 (0.4)
vp150	rp150, rp130	3		3 (0.6)
vp150	rp150	1		1 (0.2)
vp150	rp150, rp52, rp130	1		1 (0.2)
vp38	rp150		1	1 (0.2)
vp150, vp82	rp150, rp130		1	1 (0.2)
vp150, vp38, vp28	rp150, rp130	1		1 (0.2)
vp150, vp38, vp28	rp150, rp52, rp130	1		1 (0.2)

Fig. 3

p.i.: 1) ABBOTT LABORATORIES, 2) LANDINI MARIA PAOLA, 3) LAZZAROTTO TIZIANA,  
4) RIPALTI ALESSANDRO

**PLEBANI Rinaldo**  
(iscrizione Abc. Int. 358/BM)

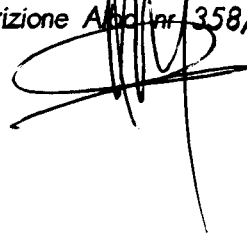



Tabella 2

PAZIENTE	Antigenemia	EIA - IgM (Behring)	COMBO - WB									
			proteine virali					proteine ricombinanti				
			p150	p82	p65	p38	p28	1A	5A	57C	CKS	μ
<b>FIO</b> (HTR, R-)												
12.4.94	-	0.007	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
5.5.94	3	0.011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
10.5.94	135	0.011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
12.5.94	30	0.052	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
19.5.94	1	0.370	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2.6.94	2	0.279	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
16.6.94	-	0.472	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
28.6.94	17	0.885	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
7.7.94	3	1.050	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
28.9.94	-	0.104	++	-	-	-	-	+++	-	+++	-	+
25.10.94	-	0.135	++	-	-	-	-	+++	-	+++	-	+
<b>ARQ</b> (HTR, R-)												
22.11.94	-	0.087	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
6.12.94	-	0.075	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
13.12.94	6	1.407	-	-	+	++	-	+	+	+	-	+
22.12.94	-	>2.0	+	-	++	++	+	+	+	+	-	+
16.1.95	50	1.678	+	-	+	++	++	+	+	+	-	+
20.2.95	-	1.477	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+
<b>BOS</b> (HTR, R-)												
8.11.94	-	0.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
21.11.94	59	0.023	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
30.11.94	-	0.537	+	+	-	+	-	++	++	++	-	+
13.12.94	-	0.607	++	+	-	+	+	++	++	++	-	+
10.1.95	-	0.573	++	+	-	++	-	++	++	++	-	+
26.1.95	-	0.907	++	-	+	++	-	++	++	++	-	+
<b>FIR</b> (HTR, R+)												
27.94	-	0.149	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
24.11.94	74	0.524	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+
17.11.94	67	0.627	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+
22.11.94	10	0.539	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+
7.12.94	-	0.296	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
23.2.95	-	0.229	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
23.3.95	-	0.129	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
22.4.95	-	0.108	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
7.6.95	-	0.145	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>CIC</b> (HTR, R+)												
7.7.94	-	0.114	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12.7.94	-	0.080	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+-
21.7.94	7	0.247	-	-	-	+++	+	-	-	-	-	+
26.7.94	5	0.593	+	-	-	+++	++	-	+	-	-	+
11.8.94	-	0.772	+	+	+	+++	++	-	+	-	-	+
26.9.94	-	0.402	+	+	+	+++	++	-	+	-	-	+
10.11.94	-	0.431	+	+	+	+++	++	-	+	-	-	+

p.i.: 1) ABBOTT LABORATORIES, 2) LANDINI MARIA  
 PAOLA, 3) DAZZAROTTO TIZIANA,  
 4) RINALDI ALESSANDRO

PLEBANI Rinaldo  
 (viazione Albo nr. 358/BM)

Fig. 4a



Tabella 2 (continua)

Caso D-19427

<b>SAB.</b> (HTR, R+)												
15.11.93	-	0.010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
22.11.93	-	0.007	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
28.11.93	-	0.002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
14.12.93	-	0.036	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
12.1.94	229	0.120	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
17.1.94	369	0.157	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+
19.1.94	159	0.440	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+
24.1.94	10	0.784	+	+	-	-	+	++	-	++	-	+
9.2.94	-	0.996	+	+	-	+	++	++	+	++	-	+
2.3.94	-	0.865	+	+	-	-	+	++	+	++	-	+
<b>BAT</b> (RTR, R-)												
23.11.92	-	0.009	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
22.12.92	-	nd	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
21.1.93	45	0.697	+	-	++	-	-	-	+	-	nd	nd
3.2.93	21	0.668	+	-	++	-	-	-	+	-	-	+
10.2.93	11	0.425	+	-	++	-	-	-	+	-	-	+
24.2.93	nd	0.415	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
5.3.93	2	nd	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+
<b>FER.</b> (RTR, R-)												
5.8.91	-	0.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
9.9.91	ND	0.021	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
16.9.91	1520	0.470	+	+	-	-	+	++	-	++	-	+
3.10.91	-	0.557	+	+	-	-	+	++	-	++	-	+
20.11.91	2	0.561	+	+	-	+	+	++	-	++	-	+
<b>CUP</b> (HTR, R+)												
29.8.95	-	0.046	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
5.9.95	-	0.030	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
14.9.95	-	0.060	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
3.10.95	14	0.007	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
19.10.95	780	0.365	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
25.10.95	-	0.537	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
7.11.95	2	0.476	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
16.11.95	5	0.531	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
6.12.95	-	0.436	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<b>MAR</b> (RTR, R+)												
25.11.92	nd	0.018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
28.12.92	nd	0.380	+	+	+	++	+	++	-	++	-	+
2.2.93	20	0.235	+	-	+	+	-	++	-	++	-	+
10.2.93	3	0.314	+	-	+	+	-	++	-	++	-	+

Fig. 4b

p.i.: 1) ABBOTT LABORATORIES 2) LANDINI MARIA PAOLA, 3) LAZZAROTTO TIZIANA,  
4) RIPALTI ALESSANDRO

PLEBANI Rinaldo  
(iscrizione Albo nr 358/BM)

Tabella 3

GRUPPO DI SOGGETTI	N. di sieri	NUMERO DI CAMPIONI POSITIVI PER IgM anti-HCMV	
		test EIA	COMBO-WB
Riceventi di trapianto di cuore PCR-positivi in PMLN	85	39	58
Donne in gravidanza con infezione attiva	38	22	34

Fig. 5

p.i.: 1) ABBOTT LABORATORIES, 2) LANDINI MARIA PAOLA, 3) LAZZAROTTO TIZIANA,  
4) RIPALTI ALESSANDRO

PLEBANI Rinaldo  
(iscrizione Albo nr 358/BM)



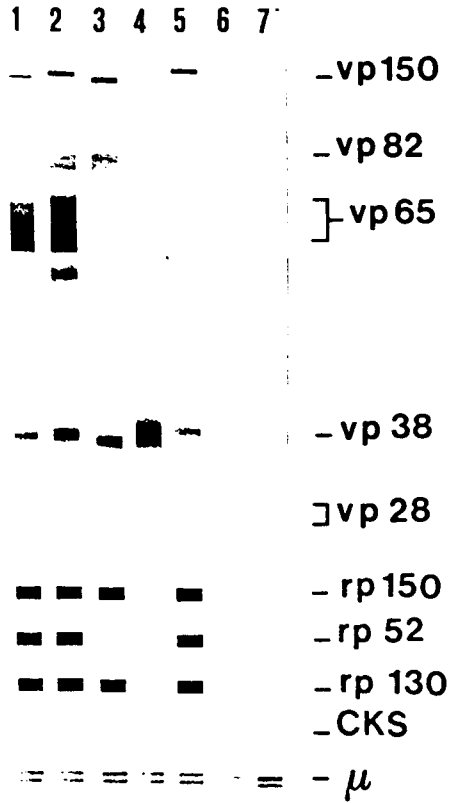



Fig. 6

p.i.: 1) ABBOTT LABORATORIES, 2) LANDINI MARIA PAOLA, 3) LAZZAROTTO TIZIANA,  
4) RIPALTI ALESSANDRO

**PLEBANI Rinaldo**  
(iscrizione Albo nr 358/BM)

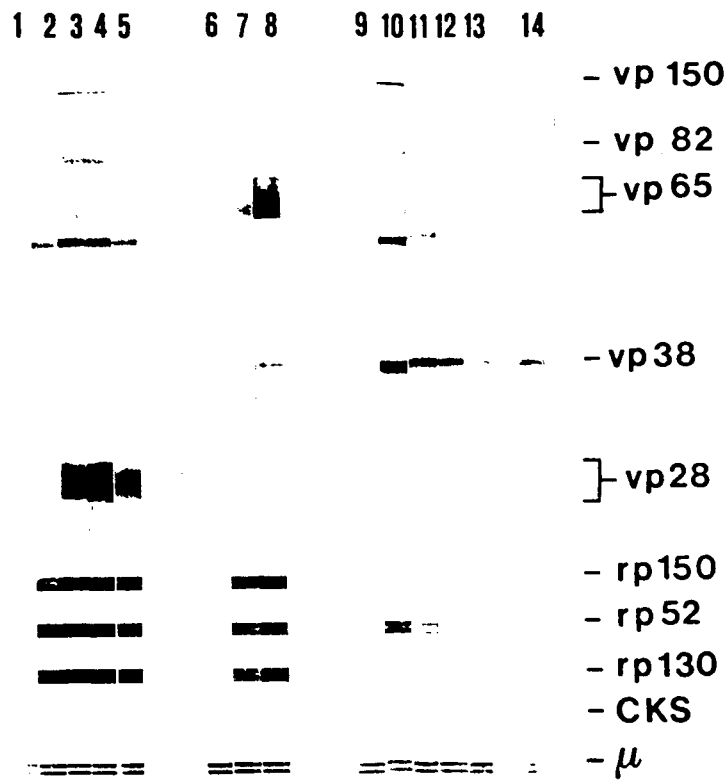
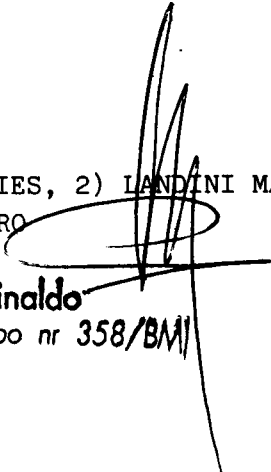
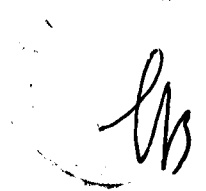


Fig. 7

p.i.: 1) ABBOTT LABORATORIES, 2) LANDINI MARIA PAOLA, 3) LAZZAROTTO TIZIANA,  
4) RIPALTI ALESSANDRO

  
**PLEBANI Rinaldo**  
(iscrizione Albo nr 358/BM)



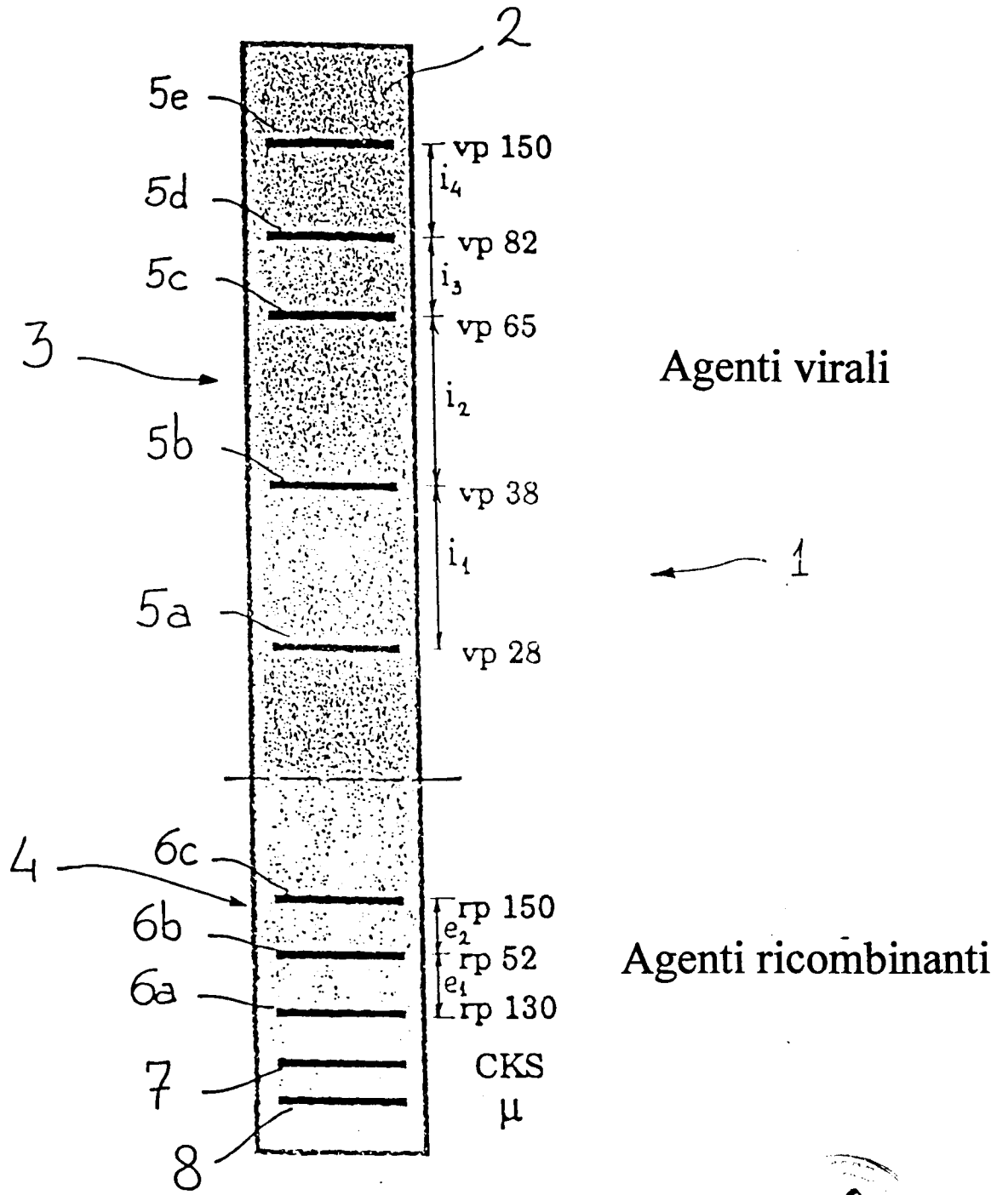


Fig. 8

p.i.: 1) ABBOTT LABORATORIES, 2) LANDINI MARIA PAOLA, 3) LAZZAROTTO TIZIANA, 4) RIPALTI ALESSANDRO

PLEBANI Rinaldo  
(iscrizione Albo nr 358/BM)