

TRADUZIONE

Del testo del brevetto europeo nr. 0796344, domanda nr. 95943035.6 del 7 Dicembre 1995, dal titolo:

"METODO DI RILEVAMENTO DI ACIDI NUCLEICI CON UNA COMPOSIZIONE DI SEQUENZA SPECIFICA"

di THE GENE POOL, INC.

di nazionalità statunitense

con sede: SUITE 392, 300 QUEEN ANNE AVENUE NORTH SEATTLE, WA 98109-4599 (U.S.A.)

Inventori: WEININGER Susan, WEININGER Arthur M.

PRESENTATA IL **4 MAG. 2007** NR. **69611-BE/2007**

★

RIASSUNTO

La presente invenzione è un nuovo metodo per rivelare e localizzare sequenze specifiche di acido nucleico in un campione con un alto grado di sensibilità e specificità. Il metodo e le nuove composizioni usate nel metodo richiedono l'uso di acidi nucleici di sonda, la preparazione di regioni di legame dell'acido nucleico e l'uso di gruppi di legame bersaglio di acido nucleico per rivelare e localizzare acidi nucleici bersaglio specifici. La rivelazione e la localizzazione dell'acido nucleico bersaglio viene eseguita anche in presenza di acidi nucleici che hanno sequenze simili. Il metodo provvede un alto grado

di amplificazione del segnale prodotto da ciascun evento legante specifico. In particolare i metodi e le composizioni vengono presentati per la rivelazione di acido nucleico HIV e HVP in campioni. Questi metodi e composizioni trovano uso nella diagnosi di malattia, monitoraggio genetico, nell'analisi forense e nell'analisi di miscele di acido nucleico. Alcune delle nuove composizioni usate nel metodo di rivelazione sono utili nella prevenzione o trattamento di condizioni patogene.

DESCRIZIONE

Sfondo dell'invenzione

1. Campo dell'invenzione

La presente invenzione provvede un metodo e composizioni per l'uso nel legame, rivelazione ed amplificazione della rivelazione di sequenze specifiche di acido nucleico bersaglio in un campione con fedeltà e precisione, anche in presenza di acidi nucleici strettamente correlati ma differenti. Il legame può comportare il chaperoning e il raggruppamento di specifiche molecole in gruppi leganti bersaglio che si legano specificamente a regioni leganti bersaglio formate mediante ibridazione di acidi nucleici di sonda e sequenze di acido nucleico bersaglio. L'amplificazione può comportare il chaperoning

e/oppure il raggruppamento di specifiche molecole in gruppi leganti booster, che si legano specificamente a regioni leganti booster formate mediante ibridazione di acidi nucleici booster con acidi nucleici di sonda, acidi nucleici bersaglio o altri acidi nucleici booster. La rivelazione comporta il provvedere uno o più marcatori rivelabili, compresi marcatori radioattivi, fotoemittenti o fluorescenti, enzimatici o altre molecole rivelabili o capaci di generare un segnale, in associazione con l'acido nucleico di sonda, il gruppo di legame bersaglio, l'acido nucleico booster o il gruppo legante booster.

2. Sfondo e descrizione della tecnica relativa

Vi è un numero crescente di casi in cui è importante essere in grado di rivelare acidi nucleici contenenti una sequenza specifica, in seguito denominati acidi nucleici bersaglio (TNA), in un campione. È desiderabile essere in grado di rivelare il TNA con il numero più piccolo di fasi di trattamento, con i componenti più semplici e con esclusione di altri acidi nucleici simili ma differenti, in seguito denominati acidi nucleici cugini (CNA). È desiderabile poter rivelare specifici TNA ad esclusione di qualsiasi e ogni CNA nel campione di rivelazione senza necessità di amplificazione o altri trattamenti post-rivelazio-

ne.

Vi sono numerosi metodi che usano acidi nucleici immobilizzati o marcati come sonde per TNA. Tuttavia, usando metodi noti è difficile discriminare tra un TNA legato all'acido nucleico sonda (PNA) contrariamente ad un CNA legato al PNA. Per esempio, uno o più disaccoppiamenti di base tra il PNA ed un CNA possono già portare ad un'ibridazione CNA-PNA che è pressoché non distinguibile da un'ibridazione TNA-PNA. Così, la sola ibridazione non è un indicatore ottimale del fatto che un PNA si sia ibridato ad un TNA unico.

Vi sono molte situazioni in cui un PNA dovrebbe venire usato per tentare di determinare se un TNA era presente in un campione che può contenere CNA. L'ibridazione del PNA a qualsiasi CNA in questa situazione potrebbe limitare il valore diagnostico che il PNA può avere per la rivelazione di un TNA, senza ulteriore verifica. Inoltre è desiderabile poter rivelare e localizzare i TNA con basso numero di copie in campioni che possono contenere molte copie di CNA, senza necessità di creare ulteriori copie di TNA. Sarebbe pure desiderabile poter confermare la presenza dei CNA indipendentemente dai TNA, senza necessità di separare i CNA e i TNA nel campione.

Sarebbe inoltre desiderabile poter amplificare

il segnale di ibridazione anche a bassa frequenza di un particolare TNA-PNA. Per questo scopo sarebbe desiderabile un metodo di polimerizzazione di copie multiple di un marcatore, in seguito indicato come acido nucleico booster (BNA) sul TNA-PNA.

La presente invenzione provvede metodi e composizioni per ottenere gli scopi desiderati suddetti. Come rivelato dalla descrizione seguente, le presenti composizioni e metodi non sono state descritte o suggerite nella tecnica. Una panoramica generale e comprensiva dello stato della tecnica nella rivelazione di acido nucleico si può trovare in Keller, H., M.M. Manak (1989) *DNA Probes*, Stockton Press.

È stato descritto un metodo per rivelare disadattamenti di coppie di basi con mezzi chimici onde determinare se un PNA si è ibridato ad un CNA anziché ad un TNA. Nel Brevetto U.S. n. 4.794.075 di Ford *et al.*, è descritto un metodo per distinguere frammenti di DNA che contengono disadattamenti di basi singole dai loro omologhi perfettamente accoppiati. Regioni a filamento singolo con un frammento duplex vengono modificate con carbodiimide, che reagisce con la guanina non accoppiata (G) e con i residui di timina (T) nel DNA. Le molecole di DNA a filamento duplex non reagiscono, mentre le molecole di DNA con base singo-

la disadattata reagiscono quantitativamente. Dopo reazione con la carbodiimmide, le molecole di DNA vengono frazionate su gel di poliacrilammide ad alta percentuale cosicché i frammenti modificati e non modificati possono essere distinti. Ford *et al.* applicano questa tecnica per localizzare e purificare sequenze di DNA differenti responsabili per la variazione del fenotipo e per la malattia ereditaria. Sebbene questo metodo sia utile per seguire variazioni in materiale genetico, esso richiede molte fasi, con componenti costosi e non offre un mezzo diretto per determinare se un PNA si è ibridato al TNA con esclusione del CNA nel campione.

Sono stati fatti tentativi per assicurare che almeno una porzione dell'ibridazione tra il PNA ed un altro acido nucleico è complementare. Un metodo comporta il monitoraggio dei prodotti di trascrizione che vengono ottenuti se il PNA si ibrida ad un acido nucleico in modo sufficiente da venire trascritto da un sito promotore contenuto nella sonda. Il Brevetto U.S. n. 5.215.899 rilasciato a Dattagupta descrive come sequenze specifiche di acido nucleico vengano amplificate attraverso l'uso di sonde a forcina, dopo ibridazione con e legame a una sequenza bersaglio, che può venire trascritta. La sonda comprende una se-

sequenza autocomplementare a filamento singolo la quale, in condizioni di ibridazione, forma una struttura a forcina avente una regione di promotore funzionale, ed inoltre comprende una sequenza di sonda a filamento singolo che si estende dal terminale 3' della sequenza a forcina. Dopo ibridazione con una sequenza bersaglio complementare alla sequenza di sonda e legame del terminale 3' della sequenza bersaglio ibridata al terminale 5' della sonda a forcina, la sequenza bersaglio è resa trascrivibile in presenza di una RNA polimerasi adatta e ribonucleoside trifosfati appropriati (rNTP). L'amplificazione viene eseguita ibridando la sequenza di TNA desiderata con la sonda, legando il TNA al PNA, aggiungendo la RNA polimerasi e rNTP agli ibridi separati e lasciando procedere la trascrizione fino a quando si è accumulata la quantità desiderata di prodotto di trascrizione di RNA. Il metodo generalmente e specificamente comporta l'uso di DNA a forcina formato con un terminale a filamento singolo non accoppiato per riassociare una sequenza bersaglio. Quando la sequenza bersaglio è legata, la produzione dei prodotti di trascrizione di RNA viene abilitata. Così il metodo comporta la rivelazione di prodotti di trascrizione secondari anziché l'uso di un gruppo di legame di acido nucleico per immobiliz-

zare direttamente e/oppure localizzare una sequenza bersaglio. Un CNA può facilmente legarsi alla sonda, e la mancanza di complementarità non dovrebbe necessariamente interferire con la formazione dell'ibrido CNA-PNA che può quindi supportare la produzione dei prodotti di trascrizione indesiderati.

Un CNA legato a PNA può essere rivelato se la mancanza di complementarità interferisce con la suscettibilità della coppia ibrida CNA-PNA da tagliare mediante una endonucleasi di restrizione. Nel Brevetto U.S. n. 5.118.605 rilasciato a Urdea e nel Brevetto U.S. n. 4.775.619 rilasciato a Urdea, sono stati forniti nuovi metodi per analizzare un analita di acido nucleico, che adottano polinucleotidi aventi sequenze oligonucleotidiche sostanzialmente omologhe ad una sequenza che interessa dell'analita, in cui la presenza o l'assenza di ibridazione con una severità predeterminata provvede il rilascio di un marcatore da un supporto. Vengono impiegate varie tecniche per legare un marcatore ad un supporto, ove con la segmentazione di un filamento singolo o doppio, un marcatore può venire liberato da un supporto ed il rilascio del marcatore può venire rivelato come indicativo della presenza di una sequenza polinucleotidica particolare in un campione. Tuttavia, questa tecnica

ha l'inconveniente che una coppia CNA-PNA può essere tagliata mediante endonucleasi di restrizione, anche se vi è un disallineamento, purché il disallineamento sia al di fuori della regione di riconoscimento dell'endonucleasi. Questo può portare all'insuccesso del saggio per identificare un ibrido di CNA-PNA.

Un altro procedimento impiega una sonda di DNA ramificato per rivelare acidi nucleici. Il Brevetto U.S. n. 5.124.246 rilasciato a Urdea et al. descrive multimeri oligonucleotidici lineari o ramificati utili come amplificatori in saggi biochimici, che comprendono (1) almeno una prima unità oligonucleotidica a filamento singolo (PNA) che è complementare ad una sequenza oligonucleotidica a filamento singolo che interessa (TNA), e (2) una molteplicità di unità oligonucleotidica del secondo filamento singolo che sono complementari ad un oligonucleotide marcato a filamento singolo. Sebbene l'ibridazione sandwich di acido nucleico amplificata e gli immunosaggi con l'uso dei multimeri siano descritti, il metodo ha la limitazione che l'ibridazione PNA-CNA può verificarsi e può portare alla produzione di un segnale indesiderato.

Oltre ai procedimenti per l'identificazione dei TNA, sono stati descritti metodi per l'amplificazione

di questo DNA. Nel Brevetto U.S. n. 5.200.314 rilasciato a Urdea, un filamento di analita polinucleotide avente una sequenza di analita (TNA) viene rivelato entro un campione contenente polinucleotidi portando a contatto il polinucleotide analita con una sonda di cattura (PNA) in condizioni di ibridazione, in cui la sonda di cattura ha un primo partner di legame specifico per il TNA ed una seconda sequenza di legame specifica per un terzo partner di legame in fase solida. Il duplex risultante viene quindi immobilizzato mediante legame specifico tra il partner di legame e i polinucleotidi non legati vengono separati dalle specie legate. Il polinucleotide analita viene opzionalmente spostato dalla fase solida, quindi amplificato mediante PCR. Gli inneschi della PCR hanno ciascuno una regione polinucleotidica in grado di ibridarsi con una regione del polinucleotide analita, ed almeno uno degli inneschi ha inoltre un partner di legame addizionale in grado di legarsi ad un partner di legame in fase solida. Il prodotto amplificato viene poi separato dalla miscela di reazione mediante legame specifico tra il partner di legame, ed il prodotto amplificato viene rivelato. Sebbene sia possibile confermare (mediante PCR) che un particolare acido nucleico sia ibridato con il PNA, la conferma è

costosa e comporta molte fasi.

Per quanto si riferisce alla descrizione che comporta l'interazione di un acido nucleico a doppio filamento ed una proteina di legame del DNA, è stato descritto un procedimento in cui una sequenza di DNA immobilizzato che contiene siti di legame per una singola proteina viene usata per purificare tale proteina. Il Brevetto U.S. n. 5.122.600 rilasciato a Kawaguchi et al. descrive una microsfera di DNA immobilizzato comprendente catene di DNA aventi sequenze di basi che si legano specificamente ad una particolare proteina, ed un veicolo avente una dimensione delle particelle non superiore a 50 μm e non inferiore a 0,01 μm che non assorbe qualsiasi proteina, detto veicolo e dette catene di DNA essendo legate tra di loro mediante un legame chimico, ed un procedimento per purificare una proteina usando detta microsfera. Poiché questo è un procedimento di purificazione per la proteina, esso non descrive un procedimento di rivelazione di un TNA né un procedimento per cui più di una proteina viene legata ad un acido nucleico a doppio filamento allo scopo di rivelare e localizzare la specifica sequenza di TNA.

EP-A-0453301 descrive un procedimento per rivelare una sequenza bersaglio polinucleotidica in un

campione, in cui le sequenze in un TNA vengono rivelate ibridando un primo ed un secondo PNA al TNA. Ciascun PNA contiene un duplex preformato, oppure un duplex che è formato attraverso un prolungamento della catena, in grado di legare una proteina di legame specifica della sequenza nucleotidica.

EP-A-0147665 descrive pure l'uso di una proteina di legame di DNA duplex sequenza-specifica come mezzo di rivelazione in un saggio di ibridazione. Anche in questo caso la sonda duplex è preformata.

EP-A-0450594 descrive la possibilità di marcatu-
ra di cosiddette molecole di sviluppatore con compo-
sti duplex specifici per la sequenza, per esempio
certi intercollanti. Questi composti vengono attacca-
ti alle molecole di sviluppatore prima dell'i-
bridazione.

US-A-4556643 descrive la rivelazione non radio-
attiva di specifiche sequenze nucleotidiche in un
campione, che comporta l'ibridazione di una sonda
contenente sequenze proteina-specifiche che si legano
al DNA.

WO93/00446 descrive oligonucleotidi a filamento
singolo comprendenti una porzione la quale, quando
viene portata a doppio filamento, lega la proteina
UL9 derivata dal virus dell'Herpes simplex, ed un'al-

tra porzione la quale, quando è portata a filamento doppio, lega i composti intercalanti.

Sommario dell'invenzione

La presente invenzione è definita nelle rivendicazioni allegate e provvede metodi mediante i quali specifiche sequenze di acido nucleico bersaglio (TNA) vengono rivelate con l'uso di acidi nucleici sonda (PNA) i quali, dopo ibridazione con TNA, sono in grado di legare i gruppi leganti bersaglio (TBA). Ciascun TBA lega almeno una regione specifica della coppia ibrida PNA-TNA, la regione legante bersaglio (TBR). Il TBA è costituito da una o più molecole, una o più delle quali possono legarsi a sequenze TBR in un modo specifico dipendente dalla sequenza o conformazione. La TBA può comprendere una o più sequenze pilota, chiamate "PILOTI" o "Sequenze di asimmetria", che assemblano e trattengono i componenti di legame del nucleotide del TBA a geometrie specifiche. I PILOTI agiscono per assemblare unità di riconoscimento di specifici acidi nucleici o altri piloti ai quali le unità di riconoscimento di un acido nucleico specifico sono attaccate, nel TBA in un modo predeterminato. Il TBA può anche contenere una o più molecole che ancorano o localizzano il TBA.

Il PNA, secondo l'invenzione, è definito nella

rivendicazione 1. Gli usi di questi acidi nucleici sono definiti in altre rivendicazioni, come lo sono kit che li comprendono.

I PNA, oltre alle sequenze TNA-specifiche, contengono pure una o più sequenze, 1/2 BBR, in grado di ibridarsi con 1/2 BBR complementari in acidi nucleici booster (BNA). Attraverso l'ibridazione dei BNA aggiunti ai 1/2 BBR di partenza presenti nel PNA, i prolungamenti dei PNA vengono fatti sotto forma di PNA-BNA e quindi ibridi BNA-BNA. Questi prolungamenti contengono una o più regioni leganti booster (BBR). Ciascuna BBR è in grado di legarsi a un gruppo legante booster (BBA). Il BBA è costituito da molecole una delle quali può legarsi ad una BBR in un modo specifico dipendente dalla sequenza o dalla conformazione. La BBA può comprendere una o più sequenze pilota, chiamate "PILOTI" o "Sequenze di asimmetria" che assemblano e trattengono i componenti di legame del nucleotide del TBA a geometrie specifiche. I PILOTI agiscono per assemblare unità di riconoscimento specifiche di acido nucleico o altri piloti ai quali unità di riconoscimento specifiche di acido nucleico sono attaccati alla BBA in un modo predeterminato. La BBA può contenere molecole che ancorano o localizzano la BBA o che consentono la rivelazione di BBA legato e

quindi dei complessi TBA-TNA-PNA ai quali essi, a loro volta sono legati. Sono descritti metodi e composizioni per l'utilizzazione di 1/2 BBR, BNA, BBR, BBA, e BBA PILOTI, compresa la loro utilizzazione come componenti di kit per test diagnostici e forensi.

Vengono descritti metodi e composizioni per procedure di prova e la produzione di un kit di prova contenente PNA, TBA, TBR, BNA, BBR e BBA e HNA per la rivelazione, localizzazione e differenziazione di specifiche sequenze di acido nucleico, comprese sequenze di acido nucleico che sono presenti in cellule umane, nel virus dell'immunodeficienza umana (HIV), nel Papillomavirus umano (HPV) e in altri sistemi contenenti acido nucleico, compresi virus e batteri.

Pertanto è uno scopo della presente invenzione il provvedere metodi e composizioni per l'uso nel legame, rivelazione ed amplificazione della rivelazione di specifiche sequenze di acido nucleico bersaglio in un campione con fedeltà ed accuratezza, anche in presenza di sequenze di acido nucleico strettamente correlate ma differenti.

È quindi un oggetto della presente invenzione il provvedere metodi e composizioni per la creazione di gruppi di legame bersaglio che si legano specificamente a regioni leganti bersaglio formate per ibrida-

zione di acidi nucleici di sonda e sequenze di acido nucleico bersaglio.

Un altro oggetto dell'invenzione consiste nel provvedere un procedimento e composizioni per la creazione di gruppi leganti booster che si legano specificamente a regioni leganti booster formate per ibridazione di sequenze di acido nucleico booster con acidi nucleici di sonda, acidi nucleici booster e acidi nucleici a forcina.

Un altro oggetto dell'invenzione è quello di provvedere un metodo e composizioni per l'uso nell'amplificazione della rivelazione di gruppi leganti bersaglio legati a regioni leganti bersaglio con l'uso di gruppi leganti booster e acidi nucleici booster.

Un altro oggetto dell'invenzione consiste nel provvedere un procedimento e composizioni che consentono l'uso di uno o più marcatori rivelabili, compresi, ma non limitatamente a questi, marcatori radioattivi, fotoemittenti, fluorescenti, molecole generatrici di enzimi o altri segnali. Questi marcatori vengono usati in associazione con acidi nucleici di sonda, gruppi leganti bersaglio, gruppi leganti booster, acidi nucleici booster o acidi nucleici a forcina.

Breve descrizione dei disegni

Le seguenti illustrazioni sono contenute nella Figura 1: Figura 1-I è un PNA contenente un 1/2 TBR, che è una sequenza monofilamento complementare a un TNA e una sequenza 1/2 BBR. La Figura 1-IIa è un TNA al quale viene aggiunto il componente di Figura 1-I, e, in condizioni ibridanti, si lega al PNA per formare i componenti della Figura 1-IIIa, un ibrido PNA-TNA contenente almeno una Figura TBR 1-IVa in un BNA che viene aggiunto ai componenti di Figura 1-IIIa e, in condizioni ibridanti, lega il 1/2 BBR di Figura 1-IIIa per formare un ibrido PNA-BNA contenente un BBR mostrato nella Figura 1-Va.

La Figura 1-IIb è un BNA che viene aggiunto ai componenti della Figura 1-I, e che, in condizioni ibridanti, lega il PNA per formare i componenti della Figura 1-IIIb, un ibrido PNA-TNA contenente un BBR della Figura 1-IVb è un TNA al quale vengono aggiunti i componenti della Figura 1-IIIb e che, in condizioni ibridanti, si lega a 1/2 TBR della Figura 1-IIIb per formare un ibrido PNA-BNA contenente una TBR mostrata nella Figura 1-Vb.

La Figura 1-IIc è un HNA che viene aggiunto ai componenti di Figura 1-I e che, in condizioni ibridanti, lega il PNA per formare i componenti della Fi-

gura 1-IIIc, un ibrido di PNA-HNA contenente un BBR della Figura 1-IVc in un TNA che viene aggiunto ai componenti della Figura 1-IIIc e che, in condizioni ibridanti, si lega a 1/2 TBR di Figura 1-IIIc per formare un ibrido PNA-BNA contenente un BBR mostrato nella Figura 1-Vc.

Gli ibridi che formano le TBR e BBR sono utili nella presente invenzione. I PNA e BNA, come indicato nella Figura 1, non possono contenere supporti di attacco e/oppure indicatori (OSA), oppure un supporto attaccato o altro mezzo di localizzazione compreso, ma non limitatamente a questo, attacchi a perline, polimeri e superfici e/oppure indicatori.

La Figura 2a è uno schema di strategie per la polimerizzazione di BNA su PNA e chiusura mediante HNA.

La Figura 2b è uno schema di altre strategie per amplificare i segnali di PNA-TNA attraverso la polimerizzazione di BNA e la chiusura mediante HNA.

La Figura 3 è un diagramma che mostra l'uso di BNA contenente 1/2 BBR multipli per BNA.

La Figura 4a è uno schema che mostra il legame di TBA e BBA a TBR e BBR, e la capacità di TBA a discriminare tra TNA e CNA. Secondo questa realizzazione, se TBA viene immobilizzato, su un letto, superfi-

cie di piastra di microtitolazione o qualsiasi altra superficie di questo tipo, soltanto complessi come il complesso X possono essere trattieneuti e rivelati, mentre complessi come il complesso XI non vengono trattieneuti.

La Figura 4b è uno schema che esemplifica eventi simili a quelli mostrati nella Figura 4a ma in un ordine di accadimento leggermente differente.

La Figura 5 è uno schema che esemplifica PNA contenente tra 1/2 TBR e nessun 1/2 BBR a PNA contenente fino a cinque 1/2 TBR e una 1/2 BBR. Gli elementi (a) e (b) di ciascun numero (I, II, III, IV, V) formano una serie la quale, per ibridazione ad un TNA, fornisce TBR con ((a) membri) o senza ((b) membri) un 1/2 BBR disponibile per l'amplificazione mediante ibridazione a BNA avente 1/2 BBR complementare.

La Figura 6a è uno schema che esemplifica un particolare TNA avente due 1/2 TBR il quale, per legame ad un PNA appropriato, forma due TBR strettamente associate in grado di legare due TBA. Un 1/2 BBR viene pure fornito per l'amplificazione.

La Figura 6b è uno schema che mostra gli stessi eventi della Figura 6a salvo il fatto che si usa un doppio TBA cosicché la discriminazione tra le singole

TBR che si verifica nei normali campioni cellulari può venire separata dalle TBR doppie anormali.

La Figura 6c è uno schema che mostra lo stesso scenario di Figura 6a salvo il fatto che vengono identificati 5 TBR nel TNA. Ciascun TBR può essere legato ad un TBA uguale o diverso, e ciascun TBA può essere marcato in modo differente, permettendo la conferma che tutti i 5 siti sono presenti nel TNA.

La Figura 6d è uno schema degli stessi eventi di Figura 6c salvo il fatto che in questo caso è mostrato un doppio TBA, estendendo quanto è mostrato nella Figura 6b all'uso del doppio TBA. Un esempio di TNA mostrato alla voce II delle Figure 6a, 6b, 6c e 6d è il DNA o RNA monofilamento di HIV.

La Figura 7 mostra LTR di HIV come TNA e due PNA, ed una strategia per la rivelazione del TNA usando PNA.

La Figura 8 è uno schema di una realizzazione dell'invenzione in cui un gruppo legante bersaglio viene usato per legare un TNA-PNA ibrido, e gruppi leganti booster vengono usati per legare i BNA polimerizzati.

La Figura 9 è uno schema di un TBA modulare in cui le sequenze di assemblaggio, sequenze di legame e sequenze di asimmetria vengono usate per controllare

le unità di riconoscimento dell'acido nucleico desiderate insieme alla formazione di un TBA.

La Figura 10 mostra TBA modulare utile nella rivelazione di sequenze specifiche di HIV.

La Figura 11 mostra TBA modulare utile nella rivelazione di sequenze del papillomavirus umano. Ciascuna unità di E2 è in realtà un dimerico della porzione legante di DNA di E2.

La Figura 12a è uno schema del frazionamento di TNA e del cambiamento di mobilità dovuto al legame di un TBA.

La Figura 12b è uno schema del frazionamento di TNA e dello spostamento migliorato in mobilità dovuto al legame di BBA oltre a TBA.

La Figura 13 mostra una strategia di rivelazione per la delezione di sequenze; un esempio di uso di questa strategia è per il saggio di integrazione del papillomavirus umano.

La Figura 14 mostra un gruppo di ordine superiore di TBA attraverso l'uso di unità di riconoscimento di acido nucleico, legante, gruppi e sequenze di asimmetria tali che vari gruppi leganti bersaglio specifici per i siti di legame in LTR di HIV vengono formati.

La Figura 15 mostra l'assemblaggio di TBA di or-

dine superiore attraverso l'uso di unità di riconoscimento di DNA, legante, assemblaggio e sequenze di asimmetria tali che vari gruppi leganti bersaglio specifici per siti di legame nel genoma HPV vengono formati.

La Figura 16 mostra la discriminazione ottenuta usando un TBA complesso e l'abilità delle molecole leganti bersaglio del competitore endogeno di eliminare il legame di TBA ad un acido nucleico cugino ma non dal TNA che contiene l'orientamento appropriato di più di un sito riconosciuto mediante TBA.

La Figura 17 mostra l'abilità di un TBA a venire mirato specificamente per legarsi ai siti di sequenze disallineate e preferibilmente legarsi ai siti in cui siti cugini non contengono tutti i disallineamenti mirati.

Breve descrizione delle sequenze

La SEQ ID N.: 1 corrisponde alla Figura 5-Ia-1 e mostra i siti di legame di classe I MHC NF-kB.

La SEQ ID N.: 2 corrisponde alla Figura 5 (Ia) e mostra i siti di legame B2-microglobulina NF-kB.

La SEQ ID N.: 3 corrisponde alla Figura 5 (Ia) e mostra il sito di legame di kappa immunoglobulina NF-kB.

La SEQ ID N.: 4 corrisponde alla Figura 5 (Ia) e

mostra uno dei siti di legame NF-kB di HIV.

La SEQ ID N.: 5 corrisponde alla Figura 5 (Ia) e mostra uno dei siti di legame NF-kB di HIV.

La SEQ ID N.: 6 corrisponde alla Figura 5 (Ia) e mostra il sito di legame NF-kB c-myc.

La SEQ ID N.: 7 corrisponde alla Figura 5 (IIa) e mostra un doppio sito di legame NF-kB di HIV.

La SEQ ID N.: 8 corrisponde alla Figura 5 (IIa) e mostra un doppio sito di legame NF-kB di HIV.

Le SEQ ID N.: 9-16 corrispondono alla Figura 5 (IIa) e mostrano un doppio sito di legame con un sito che è un sito NF-kB di HIV, e l'altro sito che è un sito di legame di SP1 di HIV.

Le SEQ ID N.: 17-18 corrispondono alla Figura 5 (IIa) e mostrano un doppio sito di legame di SP1 di HIV.

Le SEQ ID N.: 19-31 corrispondono alla Figura 5 (IIIa) e mostrano un doppio sito di legame NF-kB di HIV ed un sito di legame SP1 di HIV.

Le SEQ ID N.: 32-33 corrispondono alla Figura 5 (IVa) e mostrano un sito di legame quadruplo in cui due siti sono siti di legame NF-kB di HIV e due siti sono siti di legame SP1 di HIV.

La SEQ ID N.: 34 corrisponde alla Figura 5 (VIa) e mostra un sito quintuplo di legame in cui due siti

sono siti di legame NF-kB di HIV e tre siti sono siti di legame SP1 di HIV.

La SEQ ID N.: 35 è un esempio di 1/2 BBR, in questo caso elementi OL1, OL2 e OL3 dell'operatore sinistro del batteriofago lambda, comprese le sequenze intermedie.

La SEQ ID N.: 36 è un esempio di 1/2 BBR, in questo caso elementi OR3, OR2 e OR1 dell'operatore destro del batteriofago lambda, comprese sequenze intermedie.

La SEQ ID N.: 37 è la LTR di HIV.

La SEQ ID N.: 38 è un PNA complementare a PNA di LTR di HIV.

La SEQ ID N.: 39 è un PNA complementare ad un PNA differente da LTR di HIV rispetto alla SEQ ID N.: 38.

La SEQ ID N.: 40 è un PNA complementare a parte di LTR di HIV e contiene pure un 1/2 BBR ed una sequenza sporgente per la polimerizzazione dei BNA sul PNA.

La SEQ ID N.: 41 è un BNA complementare alla SEQ ID N.: 40 1/2 BBR.

La SEQ ID N.: 42 è un BNA che polimerizzerà sul BNA della SEQ ID N.: 41 e che, con le SEQ ID N.: 40 e 41, crea un sito di riconoscimento di *Pst*I.

La SEQ ID N.: 43 è un BNA che è complementare al BNA della SEQ ID N.: 42 e che completa un sito di riconoscimento *Bam*HI.

La SEQ ID N.: 44 è un HNA che ha un sito di riconoscimento *Bam*HI che si ibriiderà con il sito di riconoscimento *Bam*HI creato dalle SEQ ID N.: 42 e 43 sul polimero in crescita.

La SEQ ID N.: 45 è un secondo PNA il quale, come la SEQ ID N.: 40, è complementare con la parte di LTR di HIV, ma non sulla stessa sequenza come SEQ ID N.: 40. La SEQ ID N.: 45 codifica pure un 1/2 BBR ed una parte sporgente che consentirà la polimerizzazione di BNA partendo da un sito di riconoscimento *Sph*1.

Le SEQ ID N.: 46-62 sono PNA specifici di papillomavirus umano (HPV) le quali, per ibridazione con sequenze HPV, formano TBR che legano le proteine di legame del DNA di HPV.

Le SEQ ID N.: 63-71 sono unità di riconoscimento del DNA di NF-kB per l'incorporazione in TBA.

La SEQ ID N.: 72 è una sequenza di localizzazione nucleare.

La SEQ ID N.: 73 è una unità di riconoscimento della sequenza SP1.

La SEQ ID N.: 74 è una unità di riconoscimento della proteina di legame TATA.

Le SEQ ID N.: 75-84 sono unità di riconoscimento di DNA E2 di papillomavirus.

Le SEQ ID N.: 85-92 sono sequenze di asimmetria.

La SEQ ID N.: 93 è una unità di riconoscimento della proteina di legame TATA di arabidopsis.

La SEQ ID N.: 94 è una unità di riconoscimento della proteina di legame del DNA di HPV-16-E2-1.

La SEQ ID N.: 95 è una unità di riconoscimento della proteina di legame del DNA di HPV-16-E2-2.

La SEQ ID N.: 96 è una unità di riconoscimento della proteina di legame del DNA di HPV-18-E2.

La SEQ ID N.: 97 è una unità di riconoscimento della proteina di legame del DNA di HPV-33-E2.

La SEQ ID N.: 98 è una unità di riconoscimento della proteina di legame del DNA e di E2 del papillomavirus bovino.

Le SEQ ID N.: 99-102 sono sequenze leganti esemplificative.

La SEQ ID N.: 103 è una sequenza di segnale di localizzazione nucleare esemplificativa (NLS).

Le SEQ ID N.: 104-108 sono sequenze di controllo esemplificative.

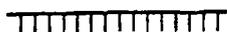
Le SEQ ID N.: 109-116 sono sequenze di TBA assemblate esemplificative.

La SEQ ID N.: 117 è un sito di legame di consen-

so di NF-kB.

La SEQ ID N.: 118 è una sequenza di amminoacido Tat di HIV.

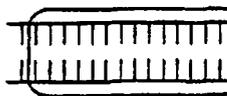
Abbreviazioni



acido nucleico a filamento singolo



acido nucleico a filamento doppio



regione legante sull'acido nucleico



nessun supporto o indicatori o supporto solido o altro mezzo di localizzazione compresi, ma non limitatamente a questi, attacco a perline, polimeri e superfici oppure indicatori = OSA

BBA gruppo legante ausiliario

BBR regione legante ausiliaria

BNA acido nucleico ausiliario

CNA acido nucleico cugino

1/2 BBR regione a filamento singolo la quale, quando ibridata alla sequenza complementare da un HNA oppure un BNA, può legare un BBA

1/2 TBR regione a filamento singolo di PNA la quale, quando ibridata alla sequenza comple-

	mentare da un TNA, può legare un TBA
OSA	supporto o attacco opzionale, circolino con riquadro
PNA	acido nucleico sonda
TBA	gruppo legante bersaglio
TBR	regione legante bersaglio
TNA	acido nucleico bersaglio
HNA	acido nucleico a forcina

Definizioni

Si comprenderà, dalla descrizione seguente, che quando si citano termini come gruppi leganti bersaglio (TBA), gruppi leganti booster (BBA), proteine leganti di DNA, proteine leganti di acido nucleico o proteine leganti di RNA, si intendono composizioni costituite da molecole che si legano a sequenze di acido nucleico bersaglio di DNA o RNA (TNA) indipendentemente dalla specificità della categoria di molecole leganti dalle quali vengono derivate. Così, per esempio, un TBA adattato a legarsi a sequenze del virus dell'immunodeficienza umana può essere più simile ad un fattore di trascrizione NF-kB che lega tipicamente sequenze di DNA. Tuttavia, come usato in questa sede, si comprenderà che TBA può essere adattato per l'uso ottimale per legarsi a sequenze di RNA di una particolare composizione di sequenza o conformazione.

La fedeltà del metodo di rivelazione descritto in questa sede dipende in gran parte dal legame selettivo di TBA e BBA a motivi di acido nucleico particolari. Si comprenderà, dalla descrizione, che le basi di discriminazione di TBA e BBA dei TNA dalle sequenze correlate (acidi nucleici cugini o CNA) possono essere la formazione di segmenti ibridi di acido nucleico di sonda preciso (PNA)-acido nucleico bersaglio (TNA) (ibridi PNA-TNA). Tuttavia, le basi di discriminazione possono altrettanto bene essere la formazione di una conformazione particolare, e possono non richiedere l'assenza completa di accoppiamenti di basi disallineate nell'ibrido TNA-PNA. Pertanto, le basi dell'operazione di TBA oppure BBA debbono essere intese come dipendenti dalla discriminazione di qualsiasi proprietà unica dell'ibrido TNA-PNA in opposizione a qualsiasi proprietà evidenziata da qualsiasi ibrido PNA-CNA che può essere formato in un campione di prova portato a contatto con un PNA dato.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

La presente invenzione è definita nelle rivendicazioni allegate. Essa fornisce un metodo per identificare specificamente un acido nucleico bersaglio (TNA) in un campione mediante l'uso di gruppi leganti bersaglio (TBA) che incorporano proteine di legame di

acido nucleico specifico. Usando acidi nucleici di sonda (PNA) specifici per una data sequenza di TNA, ed un TBA che è specifico per la regione legante bersaglio duplex (TBR) formata dopo la formazione delle sequenze ibride TNA-PNA, si forma un complesso stabile TBA-TNA-PNA. Aggiungendo inoltre sequenze amplificabili specifiche nel PNA, oltre a sequenze che contribuiscono specificamente alla formazione della TBR riconosciuta dal TBA, il legame del PNA al TNA viene rivelato e la rivelazione amplificata. Per questo scopo, uno qualsiasi di numerosi sistemi di amplificazione di acido nucleico, compresa reazione a catena di polimerasi, oppure l'uso di DNA ramificato, ciascun ramo del quale contiene un marcatore rivelabile, può essere impiegato. In particolare si descrive un nuovo metodo di amplificazione in cui la porzione amplificabile del PNA contiene sequenze sulle quali possono essere polimerizzati acidi nucleici booster (BNA). Dopo formazione di ciascun ibrido BNA-PNA, si forma una regione legante booster (BBR) alla quale si lega specificamente un gruppo legante booster (BBA). Se marcati in modo rivelabile, i BBA oppure BNA forniscono un'amplificazione praticamente illimitata dell'evento di legame originale TNA-PNA.

Secondo la presente invenzione il TNA verrà con-

siderato comprensivo delle sequenze di acido nucleico specifiche. Il TBA verrà considerato come qualsiasi gruppo molecolare che può legarsi specificamente e strettamente ad un ibrido TNA-PNA formato. Il TBA conterrà una o più molecole le cui sequenze sono sufficienti a legare i domini di legame dell'acido nucleico TBR che sono noti e possono venire usate direttamente come componenti del TBA o modificati secondo gli insegnamenti forniti nella presente. Le molecole più facilmente disponibili con tali sequenze sono i domini di legame di DNA delle proteine di legame di DNA. Specificamente, molte proteine di legame di DNA o RNA sono note e possono essere usate direttamente come proteine note non modificate, oppure il TBA può essere una proteina di legame di acido nucleico, modificata secondo gli insegnamenti specifici forniti nella presente. In quest'ultimo caso, modifiche specifiche che sono desiderabili possono comprendere l'ottimizzazione di affinità di legame, rimozione di attività indesiderate (come attività di nucleasi e riorganizzazione del TBA in presenza di altre molecole con un'affinità per componenti di TBA), ottimizzazione di selettività di una sequenza bersaglio rispetto a sequenze strettamente correlate, e ottimizzazione della stabilità.

Esempi di proteine di legame di DNA che possono venire usate secondo la presente invenzione sono le porzioni leganti del DNA del fattore di trascrizione NF-kB (p50 e p65), NF-IL6, NF-AT, rel, TBP, la proteina E2 del papillomavirus, spl, i repressori *cro* e CI dal batteriofago lambda, e proteine simili che sono proteine ben note la cui porzione di legame di DNA è stata isolata, clonata, sequenziata e caratterizzata. Inoltre qualsiasi altra proteina di legame di DNA o porzione di una proteina che è necessaria e sufficiente per legare una TBR ibrida o una BBR è inclusa. Le proteine incluse o porzioni di proteine di tipo naturale con attività di legame di DNA alterata, nonché proteine create con specificità di legame di DNA alterata, come scambio di un'elica di riconoscimento di legame del DNA da una proteina ad un'altra. Inoltre, proteine che presentano legame di acido nucleico e altre funzione di acido nucleico, come endonucleasi di restrizione, possono venire usate come funzione legante dell'acido nucleico. Le proteine che si legano a regioni bersaglio di ibridi DNA-RNA nonché ibridi RNA-RNA sono incluse. (Si veda, per esempio, Shi 1995, DeStefano 1993, Zhu 1995, Gonzales 1994, Salazar 1993, Jaishree 1993, Wang 1992, Roberts 1992, Kainz 1992, Salazar 1993(b)). I gruppi di legame pos-

sono essere costruiti con l'uso di una molecola che controlla porzioni del gruppo di legante cosicché combinazioni e geometrie specifiche dei componenti possono essere ottenute. Questa molecola è indicata in questa sede come PILOTA. I piloti possono essere costituiti da proteine o da qualsiasi combinazione di materiali organici e inorganici che realizzino la selezione combinatoria e/oppure inducano geometrie specifiche tra membri di TBA o BBA. Un controllo è un supporto stabile sul quale può essere costruito un TBA o BBA tale che la conformazione corretta del TBA o BBA viene assicurata mentre allo stesso tempo si eliminano proprietà indesiderabili di una proteina legante di acido nucleico presente in natura. Come esempio specifico di questa realizzazione, si provvede una versione modificata del fattore di trascrizione pleiotropico, NF-kB, usando una proteina *cro* di batteriofago lambda modificata come controllo. Ciascun dimero legante NF-kB mantiene l'affinità di legame picomolare per il sito di legame NF-kB mentre allo stesso tempo il gruppo legante presenta varie caratteristiche e specificità vantaggiose di produzione e stabilità.

In considerazione in quanto precede, i vari aspetti e realizzazioni della presente invenzione ven-

gono descritti in quanto segue in dettaglio.

1. Acidi nucleici sonda (PNA) e loro preparazione. I PNA della presente invenzione comprendono almeno 3 parti principali unite tra di loro. Con riferimento alla Figura 1 (I) dei disegni, la prima parte del PNA è una o più sequenze di base, denominate "1/2 TBR". Con riferimento alla Figura 1(I e IIa) dei disegni, il 1/2 TBR nel PNA è complementare ad una sequenza che interessa in un campione, il TNA contenente un 1/2 TBR. Con riferimento alla Figura 1(IIIa) dei disegni, il TNA, quando viene aggiunto al PNA in condizioni ibridanti, forma un ibrido PNA-TNA contenente un TBR. Con riferimento alla Figura 1 (I) dei disegni, la seconda parte del PNA è una sequenza di basi, denominata "1/2 BBR". Con riferimento alla Figura 1(I, IIb, IIc e IVa) dei disegni, il 1/2 BBR nel PNA è complementare ad un 1/2 BBR contenuto in un BNA oppure un HNA. Con riferimento alla Figura 1(IIIb, IIIc, e Va) dei disegni, il BNA o HNA, quando viene aggiunto al PNA in condizioni ibridanti, forma un ibrido PNA-BNA o, rispettivamente, PNA-HNA, contenente una BBR. Con riferimento alla Figura 1 (I) dei disegni, la terza parte del PNA è il OSA, indicato da un circolo riquadrato. OSA non è un supporto e/oppure un indicatore, o un supporto solido o altro mezzo di lo-

calizzazione, compreso, senza limitarsi a questi, attacco a perline, polimeri e superfici e/oppure indicatori che è/sono legati covalentemente a, o non covalentemente ma specificamente, associati con PNA. OSA può essere un atomo o una molecola che contribuisce alla separazione e/oppure localizzazione, come un gruppo legante di un supporto solido o marcatore che può venire rivelato con vari mezzi fisici compresi, senza limitarsi a questi, adsorbimento o visualizzazione di particelle emesse o di luce. I metodi per attaccare indicatori agli oligonucleotidi o per immobilizzare oligonucleotidi su supporti solidi sono ben noti nella tecnica (vedi Keller and Manak, *supra*).

Il PNA della presente invenzione può venire preparato con qualsiasi metodo adatto. Tali metodi, in generale, comprenderanno sintesi di oligonucleotidi e clonazione in un vettore replicabile. Metodi per la sintesi di acido nucleico sono ben noti nella tecnica. Quando vengono clonati o sintetizzati, la purificazione e separazione del filamento può essere necessaria per usare il prodotto come PNA puro. I metodi di preparazione di sonde di RNA sono ben noti (si veda per esempio Blais 1993, Blais 1994, che usa la trascrizione in vitro ottenuta da una reazione di PCR che comprende un promotore di T7 RNA polimerasi).

Gli esperti del settore comprenderanno che la lunghezza e la sequenza specifica del PNA dipendono dalla lunghezza e sequenza che deve venire rivelata in un TNA, e le strutture per ottenere un legame stretto e specifico del particolare TBA da usare (vedi discussione seguente sui TBA). In generale, sono adeguati PNA con lunghezze di sequenza tra circa 10 e circa 300 nucleotidi, con lunghezze di circa 15-100 nucleotidi desiderabili per molte delle realizzazioni specificamente esemplificate nella presente.

Si comprenderà pure che il PNA può essere costruito in modo da contenere più di una 1/2 TBR e per produrre più di una TBR per uno o più TBA, uguali o diversi, nonché i complessi TBR riconosciuti mediante nuovi TBA duplex e multiplex (vedi descrizione seguente relativa a questi nuovi TBA) dopo ibridazione di PNA e TNA. La Figura 5 illustra specifici PNA che contengono una o più 1/2 TBR. Sequenze specifiche che corrispondono alle sequenze 1/2 TBR illustrate nella Figura 5 (Ia, IIa, IIIa, Iva e Va) sono le SEQ ID N.: 1-34 (vedi precedente descrizione delle sequenze). Come si vede nelle Figure 2a e 2b il PNA, contenente una 1/2 TBR, può essere ibridato con uno o più BNA (vedi descrizione seguente) e la catena dei BNA polimerizzata a qualsiasi lunghezza potenziale desiderata

per l'amplificazione dell'evento di ibridazione TNA-PNA. Preferibilmente, tra 1 e 10 1/2 BBR saranno presenti nel PNA.

Come si vede nelle Figure 6a e 6b, il PNA può contenere vari 1/2 TBR, uguali o diverse, che possono ibridarsi con varie 1/2 TBR in un TNA. Ogni volta che una 1/2 TBR nel PNA si accoppia a 1/2 TBR in un TNA, una regione legante bersaglio TBR viene formata e questa si può legare ad un TBA. Inoltre, non è essenziale che tutti i TBR siano su un PNA singolo e contigui. Quindi, in una realizzazione dell'invenzione, vengono usati due PNA differenti per rivelare sequenze su un particolare TNA. Come illustrazione di questo aspetto dell'invenzione, la Figura 7 mostra una rappresentazione del terminale lungo ripetuto (LTR) del virus dell'immunodeficienza umana (HIV). Come è noto nella tecnica il LTR di HIV comprende due siti di legame NF-kB e tre siti di legame SP1, in stretta prossimità, in cui NF-kB e SP1 sono proteine di legame di DNA note. La Figura 7 fornisce due PNA, PNA1 (SEQ ID N.: 38) e PNA2 (SEQ ID N.: 39), ciascuno dei quali è complementare al filamento opposto mostrato come TNA (SEQ ID N.: 37), che mostra i due siti di legame NF-kB e i tre siti di legame SP1 di LTR di HIV. Secondo questo aspetto dell'invenzione, PNA1 si

ibrida specificamente con la sezione di TNA illustrata nella Figura 7, con basi sottolineate con un simbolo "+", mentre PNA2 si ibrida specificamente con la sezione di TNA mostrata nella Figura 7 con basi sottolineate con un simbolo "=". Ciascuno di PNA1 o PNA2 può anche contenere sequenze (indicate con i simboli "#" oppure "*" che si ibrideranno con sequenze BNA di 1/2 BBR (vedi in seguito). Inoltre, ciascuno di PNA1 e PNA2 può essere marcato in modo differente con un OSA, come un fluoroforo quale fluoresceina oppure un marcatore di rodamina che potrebbe consentire la conferma che entrambe le sonde sono state legate al TNA. Se viene rivelato un solo marcatore o nessun marcatore, si conclude che il TNA non è presente nel campione esaminato.

Secondo un altro aspetto della realizzazione illustrata nella Figura 7, si mostra un metodo per alterare la specificità del presente metodo di saggio. Cambiando la lunghezza del "gap" tra PNA1 e PNA2, in modo che la regione di TNA che rimane non ibridata venga alterata, chi realizza la presente invenzione è in grado di alterare la discriminazione del saggio.

Per esemplificare più chiaramente questo aspetto dell'invenzione, è necessario evidenziare che TBR può avere una struttura elicoidale. Così, mentre PNA1

crea TBR oppure una "faccia" dell'elica, PNA2 crea una TBR sulla stessa faccia o su una faccia differente dell'elica, a seconda della distanza tra la metà di ciascuna TBR (sottolineato in Figura 7). Se la metà di ciascun sito di legame è un prodotto intero separato di 10,5 basi, i TBR saranno sullo stesso lato dell'elica, mentre prodotti non interi separati di 10,5 basi porranno le TBR sui lati opposti dell'elica. In questo modo, qualsiasi cooperazione di legame mediante il TBA che riconosce il PNA1 di TBR e il TBA che riconosce il PNA2 di TBR può venire manipolata (vedi Hochschild, A., M. Ptashne [1986] *Cell* 44:681-687, che mostra questo effetto per il legame del batteriofago repressore lambda a due differenti siti operatori posti a distanze differenti l'uno dall'altro in un'elica di DNA). Come descritto da Perkins *et al.* ([1993] *EMBO J.* 12:3551-3558), la cooperatività tra NF-kB ed i siti SP1 è necessaria per ottenere l'attivazione di LTR di HIV. Tuttavia, per gli scopi della presente invenzione, il motivo del sito di legame doppio NF-kB-triplo SP I in LTR di HIV può essere avvantaggiato provvedendo una singola proteina di legame nuova in grado di legare simultaneamente entrambi i siti, ma soltanto se la distanza tra i siti è geometricamente fattibile. Questo viene con-

trollato dalla struttura del TBA scelto e dei PNA usati. Così, nella realizzazione esemplificata in Figura 7, le due sonde possono venire usate con una regione di intersonda sufficientemente larga di DNA a filamento singolo rimanente cosicché, anche se i siti di legame NF-kB e SP1 sono su lati opposti dell'elica, la regione a filamento singolo tra le sonde fornisce una "cerniera" sufficientemente flessibile da permettere al DNA di piegarsi e ritorcersi per adattare la geometria del TBA. In alternativa, un saggio più severo può essere progettato per restringere la distanza di intersonda cosicché il DNA possa soltanto piegarsi, ma non ritorcersi. Infine le sonde possono essere ravvicinate, su un singolo PNA usato, in modo che il DNA possa soltanto piegarsi ma non torcersi. Quindi, questa figura esemplifica e consente la produzione di sistemi di rivelazione con qualsiasi grado desiderato di discriminazione tra acidi nucleici bersaglio aventi sequenze simili, ma in affiancamenti differenti di queste sequenze.

In termini di kit diagnostico o forense per HIV, gli esperti del settore comprenderanno che gli aspetti summenzionati della presente invenzione consentono un adattamento dei componenti del kit diagnostico o forense tale da corrispondere a quanto è noto in

qualsiasi dato momento relativamente ai ceppi prevalenti di HIV o altro patogeno o condizione di malattia. Gli esperti comprenderanno pure che, mentre la rilevazione dell'infezione da HIV non è l'unica utilità della presente invenzione, per la mutabilità del genoma di HIV, è probabilmente uno degli ambienti di test più complessi per tale diagnostica. È precisamente in tale ambiente mutevole, tuttavia, in cui la flessibilità del presente procedimento, accoppiata con la sua capacità di discriminare tra sequenze correlate molto strettamente, può essere più chiaramente apprezzata. In ambienti meno mutevoli, alcune delle sofisticazioni alla quale la presente invenzione è riconducibile, non devono venire necessariamente utilizzate. Così, in un kit diagnostico per l'infezione da papillomavirus, tutte le caratteristiche di discriminazione dell'interazione TBA-TBR sono disponibili, insieme alla capacità di amplificare il segnale usando i BNA e i BBA, ma un singolo e semplice PNA, come una qualsiasi delle SEQ ID N.: 46-62, può venire usato e questo identifica sequenze uniche del papillomavirus, che è anche noto per legarsi ad un TBA come proteina E2 del papillomavirus o la sua porzione legante tronca del DNA (vedi Hegde et al. [1992] *Nature* 359:505-512; Monini et al. [1991] *J. Virol.*

65:2124-2130).

Nell'applicazione del presente procedimento alla rivelazione di un particolare TNA per gli scopi di valutare la presenza di certi acidi nucleici associati con il progredire di melanoma, epatoma, cancro del seno, cancro cervicale, cancro del polmone, cancro del colon, cancro della prostata, cancro del pancreas o cancro ovarico, il TNA può essere ottenuto da materiali di biopsia prelevati da organi e fluidi sospettati di contenere le cellule cancerose. Per la rivelazione di carenze genetiche, il TNA può essere ottenuto da campioni di pazienti contenenti le cellule influenzate. Per la rivelazione di contaminanti di fermentazione e prodotti nella produzione di cibo, prodotti chimici o prodotti biotecnologici o nel biotratamento di scarti, il TNA può essere ottenuto da campioni prelevati in varie fasi del processo di fermentazione o trattamento. Per il riconoscimento di patogeni di alimenti o farmaci oppure di contaminanti, il campione di TNA può essere prelevato dall'alimento o farmaco, tampone di cibo o superfici a contatto con il cibo, fluidi a contatto con il cibo, materiali di trattamento, fluidi e simili associati con la fabbricazione oppure a contatto con l'alimento, farmaco o campioni biologici prelevati da quelli a

contatto con l'alimento, farmaco o simili.

2. Acidi nucleici booster (BNA), regioni leganti booster (BBR) e loro preparazione. I BNA della presente invenzione sono costituiti da almeno una o più 1/2 BBR accoppiati ad un OSA. La 1/2 BBR si può ibridare a 1/2 BBR complementare contenuta nel PNA, altri BNA oppure un HNA.

Con riferimento alla Figura 1 (I, IIb e IIIb) dei disegni, il BNA più semplice è costituito da due parti. Con riferimento alla Figura 1 (IIb) dei disegni, la prima parte del BNA più semplice è una sequenza di basi complementare alla sequenza nel PNA che è denominata "1/2 BBR". Con riferimento alla Figura 1 (IIb) dei disegni, la seconda parte del BNA più semplice è OSA, evidenziata con un circolo riquadrato. OSA non è un supporto e/oppure un indicatore, o supporto solido o altro mezzo di localizzazione compresi senza a limitarsi a questi, attacco a perline, polimeri e superfici e/oppure indicatori attaccati covalentemente a, o non covalentemente ma specificamente, associati con BNA.

Con riferimento alla Figura 2a(II e III) dei disegni, il BNA contiene più di una sequenza 1/2 BBR. Il BNA illustrato in Figura 3 (II) contiene una sequenza che è complementare al PNA illustrato nella

Figura 3(I) e due altre sequenze 1/2 BBR. Il BNA illustrato nella Figura 3(III) contiene due sequenze 1/2 BBR che sono complementari alle due sequenze 1/2 BBR del BNA illustrato in Figura 3(II), più fino a "n" altri 1/2 BBR per la polimerizzazione di altri BNA.

In condizioni ibridanti, il BNA illustrato nella Figura 3(II), combinato con il PNA illustrato in Figura 3(I), crea il PNA-BNA ibrido illustrato nella Figura 3(IVa) contenente una BBR ed un prolungamento non ibridato con due altre sequenze 1/2 BBR o sequenze "ausiliarie". Le BBR create da detta ibridazione possono essere identiche, con sequenze simili o diverse. Le BBR create da detta ibridazione possono legare BBA identici, simili o diversi (si veda in seguito). I BNA possono venire preparati in modo analogo ai PNA.

In condizioni di ibridazione, l'ibrido BNA-BNA illustrato nella Figura 3(IVb), combinato con il PNA illustrato nella Figura 3(Vb), crea l'ibrido PNA-BNA illustrato nella Figura 3(VI) contenente un BBR, due altri ibridi BNA-BNA contenenti BBR e un prolungamento non ibridato con altre sequenze 1/2 BBR, una sequenza "ausiliaria". Le BBR create mediante detta ibridazione possono essere identiche, simili o diffe-

renti come sequenza. Le BBR create da detta ibridazione possono legare BBA uguali, simili o diversi (vedi in seguito). I BNA possono venire preparati in modo analogo alla preparazione di PNA.

3. Acidi nucleici bersaglio (TNA) e loro preparazione. La prima fase nella rivelazione e amplificazione dei segnali prodotti mediante rivelazione di un particolare TNA secondo il presente procedimento è l'ibridazione di tale bersaglio con il PNA in una miscela adatta. Tale ibridazione viene ottenuta in condizioni adatte ben note nella tecnica.

Il campione sospettato o noto per contenere il TNA previsto può essere ottenuto da varie fonti. Esso può essere un campione biologico, un campione di alimento o di prodotto agricolo, un campione ambientale e così via. Nell'applicazione del presente procedimento alla rivelazione di un particolare TNA per diagnosi medica o forense, il TNA può essere ottenuto da un campione di biopsia, un fluido corporeo o un essudato come urina, sangue, latte, fluido cerebrospinale, sputo, saliva, feci, aspirato polmonare, tampone della gola o genitale e simili. Inoltre, la rivelazione può essere fatta *in situ* (si veda per esempio Embretson 1993; Patterson 1993; Adams 1994).

Pertanto, i PNA specifici per vertebrati (com-

presi mammiferi e compreso l'uomo) o qualsiasi o tutti i seguenti microrganismi che interessano possono essere previsti ed usati secondo il presente procedimento:

Corinebatteri

Corynebacterium diphtheria

Bacilli

Bacillus thuringiensis

Pneumococchi

Diplococcus pneumoniae

Streptococchi

Streptococcus pyogenes

Streptococcus salivarius

Stafilococchi

Staphylococcus aureus

Staphylococcus albus

Pseudomonas

Pseudomonas stutzen

Neisseria

Neisseria meningitidis

Neisseria gonorrhoea

Enterobatteri

Escherichia coli

Aerobacteria aerogenes

Klebsiella pneumoniae

Salmonella typhosa

Salmonella choleraesuis

Salmonella typhimurium

Shigellae dysenteriae

Shigellae schmitzii

Shigellae arabinotarda

Shigellae flexneri

Shigellae boydii

Batteri coliformi

Salmonelle

Shigelle

Shigella sonnei

Altri bacilli enterici

Proteus vulgaris

Proteus mirabilis

Proteus morgani

Pseudomonas aeruginosa

Aeromonas faecalis

Vibrio cholerae

Gruppo emofili-bordetella

Hemophilus influenzae, H. ducreyi

Hemophilus hemophilus

Hemophilus aegypticus

Hemophilus parainfluenzae

Bordetella pertussis

Pastorelle

Pasteurella pestis

Pasteurella tularensis

Brucele

Brucella melitensis

Brucella abortus

Brucella suis

Bacilli che formano spore aerobiche

Bacillus anthracis

Bacillus subtilis

Bacillus megaterium

Bacillus cereus

Bacilli che formano spore anaerobiche

Clostridium botulinum

Clostridium tetani

Clostridium perfringens

Clostridium novyi

Clostridium septicum

Clostridium histolyticum

Clostridium tertium

Clostridium bifermentans

Clostridium sporogenes

Micobatteri

Mycobacterium tuberculosis hominis

Mycobacterium bovis

Mycobacterium avium

Mycobacterium leprae

Mycobacterium paratuberculosis

Actinomiceti (batteri tipo fungo)

Actinomyces israeli

Actinomyces bovis

Actinomyces naeslundii

Nocardia asteroides

Nocardia brasiliensis

Spirochete

Treponema pallidum

Treponema pertenue

Specie Proteus

Treponema carateum
Spirillum minus
Streptobacillus moniliformis
Borrelia recurrentis
Leptospira icterohemorrhagiae
Leptospira canicola

Micoplasmi tripanosomi

Mycoplasma pneumoniae

Altri patogeni

Listeria monocytogenes
Erysipelothrix rhusiopathiae
Streptobacillus moniliformis
Donovania granulomatis
Bartonella bacilliformis

Rickettsie (parassiti tipo batteri)

Rickettsia prowazekii
Rickettsia mooseri
Rickettsia rickettsii
Rickettsia conorii
Rickettsia australis
Rickettsia sibiricus
Rickettsia akari
Rickettsia tsutsugamushi
Rickettsia burnetti
Rickettsia quintana

Clamidia (parassiti batterici/virali non classificabili)

Chlamydia agents (nome incerto)

Funghi

Cryptococcus neoformans
Blastomyces dermatidis
Histoplasma capsulatum
Coccidioides immitis
Paracoccidioides brasiliensis
Candida albicans
Aspergillus fumigatus
Mucor corymbifera (Absidia corymbifera)
Rhizopus oryzae
Rhizopus arrizus
Rhizopus nigricans
Sporotrichum schenkii
Fonsecaea pedrosoi
Fonsecaea compact
Fonsecaea dermatidis
Cladosporium carrioni
Phialophora verrucosa
Aspergillus nidulans
Madurella mycetomi
Madurella grisea
Allescheria boydii
Phialophora jeanselmei
Microsporum gypsum

Ficomiceti

Trichophyton mentagrophytes
Keratinomyces ajelloi
Microsporum canis
Trichophyton rubrum
Microsporum adouini

Virus

Adenoviruses

Herpes virus

Herpes simplex
Varicella (varicella)
Herpes zoster (Shingles)
Virus B
Cytomegalovirus

Pox virus

Variola (vaiolo)
Vaccinia
Vaiolo bovino
Paravaccinia
Molluscum contagiosum

Picornavirus

Poliovirus
Coxsackievirus
Virus ECHO
Rinovirus

Mixovirus

Influenza (A, B, e C)
Parainfluenza (1-4)
Virus della parotite
Virus della malattia di Newcastle
Virus del morbillo
Virus della peste bovina
Virus del cimurro canino
Virus sinciziale respiratorio
Virus della rosolia

Arbovirus

Virus dell'encefalite equina orientale
Virus dell'encefalite equina occidentale
virus Sindbis
virus Chikugunya
Virus della foresta Semliki
virus Mayora
Virus dell'encefalite di St. Louis
Virus dell'encefalite californica
Virus della febbre da zecche del Colorado
Virus della febbre gialla
Virus Dengue

Reovirus

Reovirus di tipo 1-3

Retrovirus

Virus dell'immunodeficienza umana (HIV)
Virus linfotropico della cellula T umana I e II (HTLV)

Epatite

Virus dell'epatite A
Virus dell'epatite B
Virus dell'epatite nonA-nonB
Epatite C, D, E

Virus di tumori

Virus della leucemia di Rauscher
Virus Gross
Virus della leucemia di Maloney
Virus del papilloma umano

Un esperto del settore può comprendere che generalmente è necessario trattare i campioni sospettati di contenere un particolare TNA in modo tale da produrre frammenti che possano venire facilmente ibridati con il PNA. Può essere necessario trattare il campione di prova per realizzare il rilascio o per estrarre il TNA per l'ibridazione, per esempio mediante esposizione di sangue o altre cellule ad un ambiente ipotonico, o altrimenti disgregazione del campione con mezzi più energici. Quando si ritiene che il TNA sia presente nella forma a filamento doppio, sarebbe naturalmente desiderabile separare i filamenti per rendere il TNA ibridabile in forma di filamento singolo con metodi ben noti nella tecnica, compreso, ma non limitatamente a questo, riscaldamento o esposizione limitata a condizioni alcaline che possono essere neutralizzate dopo aggiunta del PNA a filamento singolo per permettere l'ibridazione. I metodi per preparare bersagli di RNA sono ben noti (vedi Waterhouse 1993, Mitchell 1992).

La frammentazione dei campioni di acido nucleico contenenti TNA è normalmente necessaria per diminuire la viscosità del campione e aumentare l'accessibilità dei TNA ai PNA. Tale frammentazione viene eseguita con mezzi casuali o specifici noti nella tecnica. Così, per esempio, nucleasi specifiche note per tagliare con una particolare frequenza in un particolare genoma da analizzare, possono venire usate per produrre frammenti con un peso molecolare medio noto. Inoltre, altre nucleasi, fosfodiesterasi, esonucleasi ed endonucleasi, mezzi di taglio fisico e sonicazione sono tutti metodi utilizzabili per questo scopo. Questi procedimenti sono ben noti nella tecnica. L'uso degli enzimi di restrizione per la frammentazione del DNA è generalmente preferito. Tuttavia, il DNA può anche venire frammentato con vari mezzi chimici come l'uso dei tipi seguenti di reagenti: EDTA-Fe(II) (secondo Stroebel et al. [1988] *J. Am. Chem. Soc.* 110:7927; Dervan [1986] *Science* 232:464); Cu(II)-fenantrolina (secondo Chen and Sigman [1987] *Science* 237:1197); enzima di restrizione di classe IIS (secondo Kim et al. [1988] *Science* 240:504); DNAsi ibrida (secondo Corey et al. [1989] *Biochem.* 28:8277); bleomicina (secondo Umezawa et al. [1986] *J. Antibiot.* (Tokyo) Ser. A, 19:200); neocarcinostatina

(Goldberg et al. [1981] *Second Annual Bristol-Myers Symposium in Cancer Research*, Academic Press, New York, p. 163); e metidiopropil-EDTA-Fe(II) (secondo Hertzberg et al. [1982] *J. Am. Chem. Soc.* 104:313). La rimozione delle proteine, per esempio mediante trattamento con una proteasi, è pure generalmente desiderabile, e metodi per realizzare la rimozione della proteina dai campioni di acido nucleico senza perdita apprezzabile di acido nucleico sono ben noti nel campo.

I TNA della presente invenzione debbono essere sufficientemente lunghi da avere una quantità sufficiente di ibrido a doppio filamento affiancato a TBR, cosicché un TBA possa legarsi in modo non perturbato ai terminali del frammento non legato. Tipicamente, i frammenti nel campo da circa 10 a circa 100.000 nucleotidi, e preferibilmente nel campo da circa 20 nucleotidi a circa 1.000 nucleotidi, vengono usati come dimensione media per i frammenti di TNA. Esempi di specifiche sequenze di TNA che possono venire rivelate sono sequenze complementari alle sequenze di PNA descritte nella presente per la rivelazione di sequenze cellulari normali, sequenze cellulari anomale (come negli oncogeni attivati, geni estranei integrati, geni difettivi geneticamente) e sequenze di acido

nucleico patogeno-specifiche, per le quali sono note proteine di legame di acido nucleico specifiche, o che possono venire prodotte secondo metodi descritti nella presente descrizione. Con riferimento alla Figura 7, un TNA specifico correlato a HIV è presentato come SEQ ID N.: 37.

4. Estensioni al PNA usando BNA, loro preparazione e amplificazione del segnale. In condizioni ibridanti, si possono aggiungere BNA che si ibridano a PNA, ibridi PNA-BNA, BNA e ibridi BNA-BNA. Le suddette aggiunte possono essere fatte in modo polimerico non vettoriale o in modo vettoriale, con un ordine noto di BNA. Con riferimento alla Figura 2a, si presenta un prodotto ausiliario semplice. Un polimero ausiliario viene prodotto aggiungendo due BNA, illustrati nella Figura 2a(Ib e Ic), i quali, quando vengono combinati in condizioni ibridanti con il PNA, formano ibridi PNA-BNA-BNA, comprensivi del PNA e del prolungamento booster, illustrati nella Figura 2a(IIa, IIb, IIc e IID) che formano almeno una sequenza 1/2 BBR non accoppiata. Ciascuna sequenza 1/2 BBR non accoppiata, illustrata nella Figura 2a(IIa, IIb, IIc, IID) si può ibridare con altri BNA per formare ulteriori prolungamenti "booster". Ciascuna sequenza 1/2 BBR non accoppiata, illustrata nella Figu-

ra 2a(IIa, IIb, IIc e IID) si può ibridare con altri HNA, illustrati in Figura 2a(IIa e IIIb). L'ibridazione di HNA, che non si può ibridare ad altri BNA, agisce come "chiusura" dell'aggiunta di BNA su PNA, come illustrato nella Figura 2a(IVa, IVb, IVc e IVd).

Con riferimento alla Figura 2b, è possibile controllare e specificare l'ordine di componenti dei prolungamenti del PNA. Se è necessaria una singola BBR, si aggiunge un HNA contenente la sequenza complementare a 1/2 BBR nel PNA al PNA per produrre una singola BBR e chiudere qualsiasi prolungamento booster al PNA. Se si devono aggiungere altre BBR al PNA, si può realizzare un prolungamento controllato del PNA.

Con riferimento alla Figura 2b viene presentato un booster semplice. Il prolungamento del polimero vettoriale viene eseguito aggiungendo un BNA che è specifico per il PNA, come illustrato nella Figura 2b(Ia e IIa), il quale, quando combinato in condizioni ibridanti con il PNA, forma gli ibridi PNA-BNA-BNA, comprensivi del PNA e dei prolungamenti booster. Questi prolungamenti, se marcati con OSA forniscono un metodo per amplificare fortemente qualsiasi segnale prodotto dopo il legame di un PNA a un TNA nel campione. Inoltre, legando BBA marcato a BBR nel po-

limero, si ottiene un'ulteriore amplificazione.

Uno qualsiasi di vari metodi può venire usato per preparare i BNA, compresa per esempio sintesi chimica nota oppure metodi di produzione di DNA ricombinante. In quest'ultimo metodo, un numero praticamente non limitato di BNA può venire prodotto in modo semplice ed economico, per esempio mediante produzione in procarioti (per esempio *E. coli*) di un DNA plasmide avente unità multiple delle sequenze di BNA specifiche affiancate mediante siti di restrizione aventi terminali sporgenti. In questo modo, per esempio, i siti operatori sinistro o destro del batteriofago lambda, o qualsiasi altra sequenza di DNA o acido nucleico nota per legarsi specificamente e strettamente ad un particolare BBA come proteina legante di DNA o RNA, può venire prodotto in un numero praticamente illimitato di copie, con ciascuna copia affiancata da un *EcoRI*, *PstI*, *BamHI* o uno qualsiasi di vari altri siti di nucleasi di restrizione comune. In alternativa, un polimero in siti ripetuti può essere separato con siti di estrazione unici non presenti nel polimero. Grandi quantità di plasmide pBR322, pUC o altro plasmide avente copie multiple di queste sequenze vengono prodotte con metodi ben noti nella tecnica, il plasmide tagliato con l'enzima di restri-

zione che affianca il sito polimerizzato e le copie multiple liberate degli operatori isolati per cromatografia o con qualsiasi altro mezzo conveniente noto nel campo. Il BNA, prima dell'uso, viene quindi separato dal filamento ed è poi riconducibile per polimerizzazione su un PNA che codifica una copia complementare a filamento singolo dell'operatore come una 1/2 BBR. Il BNA può venire polimerizzato vettorialmente sul PNA usando enzimi di restrizione differenti per affiancare ciascuna ripetizione del polimero nel plasmide usato per produrre copie multiple del BNA. In alternativa, il polimero di BNA può venire ibridato al PNA mediante sovrapposizioni ad una o entrambe le estremità del polimero BNA, senza necessità di separare i filamenti e riassociare ciascun segmento di BNA. Esempi di sequenze specifiche di BNA sono state fornite in precedenza nella sezione intitolata "Descrizione delle sequenze", come SEQ ID N.: 35-36. Per stabilizzare il BNA polimero si può usare DNA ligasi per legare covalentemente i BNA ibridati.

5. Acidi nucleici a forcina (HNA) e loro preparazione. Gli HNA descritti nella presente comprendono almeno due parti principali unite tra di loro. Una sequenza a filamento singolo, che è complementare a 1/2 BBR, ed una regione di acido nucleico a filamento

doppio formata, in condizioni di ibridazione, mediante la autoassociazione di sequenze autocomplementari entro HNA. Con riferimento alla Figura 1(IIc) dei disegni, il 1/2 BBR nella HNA può essere costruito in modo da essere complementare alla sequenza 1/2 BBR nel PNA. Con riferimento alla Figura 1(I, IIc e IIIc) dei disegni, il summenzionato HNA, quando viene aggiunto a PNA in condizioni ibridanti, forma un ibrido PNA-HNA contenente una BBR. Con riferimento alla Figura 1(IIIc, IVc e Vc) dei disegni, un ibrido PNA-HNA, in condizioni ibridanti, dopo aggiunta di TNA può formare un ibrido TNA-PNA-HNA contenente una TBR e una BBR.

Con riferimento alla Figura 2a e 2b, HNA può venire usato per chiudere o terminare l'aggiunta dei prolungamenti di BAN al PNA. I due BNA della Figura 2a(Ib e Ic) possono associarsi per formare l'ibrido mostrato nella Figura 3(IVb) o possono ibridarsi direttamente ed individualmente al PNA come mostrato nella Figura 2a(Ia-c, IIa-d). I due HNA (mostrati nella Figura 2a(IIIa e IIIb)) possono chiudere l'ibridazione del BNA con altri BNA che si prolungano dal PNA, come illustrato nella Figura 2a(IVa-d). HNA nella Figura 2a(IIIa) può terminare gli ibridi PNA-BNA mostrati nella Figura 2a(IIb e IID) e qualsiasi

ibrido PNA-BNA con una 1/2 BBR a filamento singolo che è complementare a 1/2 BBR in HNA illustrato nella Figura 2a(IIIa). Analogamente, HNA nella Figura 2a(IIIb) può terminare gli ibridi PNA-BNA mostrati nella Figura 2a(IIa e IIc) e qualsiasi ibrido PNA-BNA con due filamenti singoli 1/2 BBR che sono complementari alle 1/2 BBR in HNA illustrato nella Figura 2a(IIIb).

Si costruiscono HNA che termineranno gli ibridi PNA-BNA che sono costruiti dall'aggiunta sequenziale di BNA a PNA come illustrato nella Figura (2b). Le sequenze 1/2 BBR a filamento singolo illustrate nella Figura 2b(Ia, IIIa, Va e VIIa) sono specificamente complementari con le sequenze 1/2 BBR a filamento singolo illustrate nella Figura 2b(Ib, IIIb, Vb e VIIb) e producono gli ibridi chiusi unici PNA-BNA-HNA illustrati nella Figura 2b(Ic, IIIc, Vc e VIIc).

Le sequenze autocomplementari nell'HNA e la sequenza ad ansa che lega le sequenze a forcina autocomplementari possono essere di qualsiasi composizione e lunghezza, purché non impediscano sostanzialmente o inibiscano la presentazione della 1/2 BBR a filamento singolo che comprende parte di HNA mediante HNA o si leghino selettivamente a BBA o TBA. Le sequenze ad ansa debbono venire scelte in modo che la

formazione dell'ansa non impedisca la formazione della forcina. Esempi di HNA utili nella presente domanda sono forniti come SEQ ID N.: 44 (vedi descrizione delle sequenze precedenti).

6. Assemblaggio del legame bersaglio (TBA) e sua preparazione. Un TBA può essere qualsiasi sostanza che si lega ad una particolare TBR formata mediante ibridazione di particolare TNA e PNA, purché TBA abbia almeno uno dei seguenti attributi:

(a) Il TBA deve legarsi alla TBR in modo che è altamente specifico per la TBR(o le TBR) che interessano. Quindi, la TBA deve discriminare tra le TBR presenti nell'ibrido TNA-PNA e sequenze duplex simili formate da ibridi PNA-CNA. Il TBA deve legarsi all'ibrido PNA-CNA con un'avidità sufficientemente bassa da permettere che, per lavaggio del complesso TBA-TNA-PNA, l'ibrido PNA-CNA venga spostato mentre l'ibrido PNA-TNA non viene spostato;

(b) il TBA deve legarsi avidamente alla TBR creata per ibridazione di TNA con PNA. Le affinità di legame nel campo da 10^{-5} a circa 10^{-12} o più sono generalmente considerate sufficienti. Come notato in seguito, in alcuni casi può essere desiderabile utilizzare un particolare TBA che ha un'avidità molto bassa per una particolare TBR, ma che ha un'affinità

fortemente accresciuta quando si provvede una particolare configurazione di TBR multiple cosicché il quadrato dell'affinità di TBA per ciascun TBR diventa l'affinità rilevante di tale particolare TBA.

Esempi di componenti utili per il legame di DNA nella formazione di TBA comprendono, senza essere limitati a NF-kB, proteina E2 di papillomavirus, fattore di trascrizione SP1, enzimi di restrizione inattivi, anticorpi, ecc. Ciascuna di queste proteine è stata riconosciuta nella tecnica per contenere sequenze che si legano a sequenze di acido nucleico particolari e le affinità di queste interazioni sono note. Naturalmente il metodo della presente invenzione non è limitato all'uso di queste proteine di legame di DNA note o loro frammenti. Dalla presente descrizione, appare evidente a chi ha un'ordinaria esperienza, che il presente metodo può facilmente venire applicato all'uso di nuovi TBA che presentano almeno gli attributi richiesti suddetti. Così, per esempio, in WO 92/20698, è descritta una molecola di legame a DNA con sequenza specifica comprendente un oligonucleotide coniugato formato mediante attacco covalente di un farmaco di legame di DNA ad un oligonucleotide che forma un triplex. Il metodo di tale descrizione può essere usato per produrre nuovi TBA

per l'uso secondo la presente descrizione, purché i TBA così formati soddisfino i criteri suddetti. Inoltre, i metodi dei Brevetti U.S. n. 5.096.815, 5.198.346, e WO88/06601, possono venire usati per generare nuovi TBA per l'uso secondo il metodo della presente invenzione. Anticorpi specifici o loro porzioni possono venire usati (si veda per esempio Blais 1994).

Quando il TBA è una proteina o un complesso di proteine, si riconoscerà che uno qualsiasi di vari metodi usuali nella tecnica può venire usato per produrre il TBA. Il TBA può venire isolato dal suo ambiente in cui si trova in natura, o, se questa non è una soluzione pratica, prodotto con tecniche standard di biologia molecolare. Così, usando per esempio NF- κ B, con le porzioni di legame di DNA delle subunità p50 o p65, questo gruppo di legame può venire prodotto secondo metodi ricombinanti noti nel campo (vedi per esempio Ghosh [1990] *Cell* 62:1019-1029, che descrive la clonazione della subunità di legame di DNA di p50 di NF- κ B e l'omologia di tale proteina a *rel* e *dorsal*).

Molti DNA e altre proteine di legame di acido nucleico sono noti e possono venire usati come TBA secondo la presente invenzione. Quando la sequenza di

amminoacido di qualsiasi DNA, RNA:DNA, RNA o altra proteina di legame di acido nucleico è nota, un'opportuna sequenza di DNA codificante per la proteina può essere preparata con mezzi sintetici, oppure si può usare una copia di cDNA di mRNA che codifica la proteina ottenuta da una fonte di tessuto adatta. Inoltre, le copie genomiche che codificano la proteina possono essere ottenute e gli introni possono essere connessi secondo metodi noti nella tecnica. Inoltre, si può sintetizzare chimicamente il TBA.

Quando è stata ottenuta la sequenza codificante appropriata, si può adottare la mutagenesi diretta al sito per alterare la sequenza di amminoacidi codificata per produrre proteine di legame di acido nucleico mutante che presentano caratteristiche di legame più desiderabili di quelle della proteina di legame dell'acido nucleico originale. Come esempio di questo procedimento, la sequenza di amminoacidi delle porzioni leganti di DNA di NF- κ B possono essere alterate in modo da produrre una molecola di NF- κ B' con legami più stretti al sito di legame di NF- κ B (vedi esempi seguenti - rivelazione HIV e blocco di HIV).

Per chiarire ulteriormente questo aspetto dell'invenzione si riportano le seguenti considerazioni. Usando come esempio NF- κ B, si può preparare un TBA u-

sando la molecola NF-kB naturale. Tuttavia, poiché questa molecola è presente in piccolissime quantità nelle cellule, e poiché le subunità di questa proteina di legame del DNA sono state clonate, sarebbe più ragionevole preparare grandi quantità del complesso con mezzi di DNA ricombinante come è già stato fatto per questa proteina (si veda per esempio Ghosh [1990] *Cell* 62:1019-1029). NF-kB è un induttore pleiotropico di geni che partecipano alle risposte regolatrici immunitarie, infiammatorie e della crescita a attacchi patogeni primari (virali, batterici o da stress) o secondari (citochina infiammatoria). NF-kB è una proteina di legame di DNA dimerico comprendente una subunità p50 ed una p65, entrambe le quali vengono a contatto e si legano a sequenze di DNA specifiche. Allo stato inattivato, NF-kB risiede nel citoplasma cellulare, complessato con un inibitore specifico, I-kB, per formare un eterotrimerico citoplasmatico. Per attivazione, l'inibitore viene decomplessato ed il dimerico p50-p65 si riposiziona attraverso un segnale di localizzazione nucleare specifico (NLS) del nucleo della cellula ove può legarsi al DNA e realizzare il suo ruolo come attivatore di trascrizione di numerosi geni (si veda Grimm and Baeuerle [1993] *Biochem. J.* 290:297-308, per una panoramica della condizione del-

la tecnica relativa a NF-kB).

Il dimerico p50-p65 si lega con affinità picomolare a sequenze di accoppiamento del consenso GGGAMTNYCC (SEQ ID N.: 117), con affinità leggermente differenti a seconda della sequenza esatta. È importante notare che gli omodimeri di p50 e p65 sono già stati osservati. Questi omodimeri mostrano differenti proprietà biochimiche nonché differenti affinità di sequenze di legame entro e simili al consenso suddetto. Così, a seconda delle caratteristiche di legame desiderate del TBA, si può usare un eterodimero p50-p65, un omodimero p50-p50, un omodimero p65-p65 o frammenti dei dimeri suddetti.

Un modo in cui vari nuovi TBA possono venire prodotti è rappresentato schematicamente nella Figura 9. Le unità di riconoscimento dell'acido nucleico del TBA possono essere assemblate ed associate con unità di riconoscimento di acido nucleico di TBA simili o diverse attraverso un "chaperone". Il chaperone è una struttura sulla quale i vari elementi di riconoscimento di TBA vengono costruiti e che conferisce proprietà desiderabili alle unità di riconoscimento dell'acido nucleico. Il chaperone è formato da qualsiasi sequenza che provveda sequenze di assemblaggio come unità di riconoscimento di acido nucleico uguali o

diverse che vengono portate in associazione stretta e stabile tra di loro. Così, per esempio, nel caso di un TBA progettato per legarsi strettamente alle TBR di NF-kB, viene assemblato un TBA per provvedere sequenze *cro* lambda come sequenze di assemblaggio, legate alle sequenze di legame dell'acido nucleico attraverso NF-kB p50 o p65. Le sequenze di legame di acido nucleico p50 o p65 sono legate alle sequenze *cro* al terminale carbossilico o amminico di *cro* e al terminale carbossilico o amminico dell'unità di riconoscimento di acido nucleico di p50 o p65. Le sequenze di legame vengono opzionalmente fornite per consentire un distanziamento appropriato delle unità di riconoscimento dell'acido nucleico per un legame ottimale della TBR.

Le sequenze assemblate, precedentemente esemplificate mediante sequenze *cro* e CI (SEQ ID N.: 104-108), comprendono qualsiasi oligopeptide stabile che si lega naturalmente e fortemente a sequenze simili. Così, nel caso di *cro*, è ben noto che un dimero di *cro* si lega ai siti operatori batteriofago lambda (Anderson *et al.* [1981] *Nature* 290:754-758; Harrison and Aggarwal [1990] *Ann. Rev. Biochem.* 59:933-969). Le unità di monomero di *cro* si associano strettamente e specificamente tra di loro. Così, legando sequenze

di unità di riconoscimento di DNA alle sequenze *cro*, si ottiene un'associazione ravvicinata e stretta.

Le sequenze di legante opzionale comprendono qualsiasi sequenza di amminoacido che non interferisca con il gruppo TBA o con il legame dell'acido nucleico, e che non sia labile tanto da liberare l'unità di riconoscimento dell'acido nucleico dal TBA completo. È desiderabile, ma non indispensabile, che le sequenze leganti siano legate covalentemente ad altri gruppi di componenti di legame. L'associazione può essere specifica così da contribuire all'assemblaggio ed alla produzione dei gruppi di legame. Esempi di tali sequenze comprendono, senza essere limitati a queste, sequenze ben note che si trovano in vari domini leganti in proteine strutturali. Così, per esempio, nella proteina di repressore lambda vi è una sequenza legante tra il dominio di legame di DNA ed il dominio di dimerizzazione che è utile per questo scopo. Molte altre di tali sequenze sono note e la loro sequenza precisa non è critica per l'invenzione, purché si esegua una sperimentazione usuale per assicurare stabilità e non interferenza con il legame dell'acido nucleico. Esempi di tali sequenze vengono forniti come Met Ser e SEQ ID N.: 99-102. L'inserimento di specifici siti di proteolisi noti in

questi leganti è pure una parte integrale della presente invenzione. La presenza di tali siti nelle sequenze leganti creerà vantaggi di produzione, consentendo di assemblare molecole differenti sulla struttura del chaperone.

Oltre alle unità di riconoscimento dell'acido nucleico, sequenze leganti opzionali e sequenze di assemblaggio, i nuovi TBA della presente invenzione hanno opzionalmente sequenze di asimmetria o TNA e PILOTA e una o più unità OSA. Le sequenze di asimmetria sono fornite per incoraggiare o prevenire certe associazioni desiderabili o indesiderabili. Per esempio, nel caso in cui si desideri un TBA avente unità di riconoscimento di DNA omodimero p50, le sequenze di asimmetria vengono fornite per disgregare l'associazione naturalmente più forte delle subunità p50 e p65 di NF-kB, senza distruggere le sequenze di assemblaggio portando insieme le subunità p50. Esempi di tali sequenze sono forniti in questa sede come SEQ ID N.: 85-92 e SEQ ID N.: 105 e 106.

In una configurazione differente, le sequenze di subunità p50 di NF-kB vengono portate in stretta associazione con sequenze dell'unità di riconoscimento del DNA del fattore di trascrizione SP1. Questo è desiderabile nel caso in cui un motivo legante NF-

κB/SP1 abbia un significato, come in LTR di HIV, quando è noto che esiste un motivo di almeno sei siti di riconoscimento della proteina legante del DNA, due NF-κB, tre SP1 ed un sito TATA. Poiché è solo noto che il secondo sito NF-κB ed il primo sito SP1 sono significativi per la regolazione della trascrizione di HIV (Perkins et al. [1993] *Embo J.* 12:3551-3558), questa particolare configurazione di TBA è utile non soltanto nella rivelazione di HIV ma come agente terapeutico o profilattico contro l'infezione da HIV (vedi in seguito). In modo simile, la regione di controllo lunga (LCR) del papillomavirus umano può venire usata come regione di controllo chiave per il sondaggio secondo questo procedimento.

In considerazione dei differenti elementi che possono venire associati, tipo di cassette, secondo questo procedimento di formazione di TBA, si produce una varietà di TBA praticamente illimitata. Nella Figura 10, una serie di differenti molecole, indicate come "HIV-rivelazione I-IV" sono esemplificate, ed in queste "CHAP" indica il chaperone, "nfκb" indica le subunità NF-κB, "spl" indica l'unità di riconoscimento di acido nucleico del fattore di trascrizione SP1, e "TATA" indica un dimerico dell'unità di riconoscimento di DNA di una proteina di legame di DNA della se-

quenza TATA (TBP), pure nota come proteina di legame TATA, o TBP. Queste configurazioni sono inoltre esemplificate in seguito e sono tutte parti integrali della presente invenzione.

In un'altra configurazione ancora, la struttura modulare mostrata nella Figura 9 è adatta alla rivelazione e/oppure trattamento o profilassi di un patogeno totalmente differente. Nella Figura 11 vengono prodotte in modo simile a quanto suddetto molecole "HIV-rivelazione I-IV", una serie di molecole "HPV-rivelazione I-IV". In questa realizzazione, il vantaggio viene assicurato dalle proprietà di legame del DNA della proteina E2 del papillomavirus umano (HPV). Inoltre, i ruoli di SP1 e TBP vengono avvantaggiati provvedendo specifiche unità di riconoscimento di DNA atte a legarsi a queste sequenze nel genoma HPV. Nella formazione dei TBA specifici per E2, per l'uso nella rivelazione dell'infezione da HPV, può essere desiderabile usare una qualsiasi delle SEQ ID N.: 75-84 o 93-98 come unità di riconoscimento di DNA di E2. Può essere particolarmente utile un TBA contenente un dominio di legame di DNA del dimero E2 bovino e del dimero E2 umano.

Le varie sequenze suddescritte possono venire legate chimicamente usando materiali di partenza oli-

gopeptidici puri, oppure possono venire legate provvedendo la codifica di acidi nucleici ricombinanti, attraverso il codice genetico ben noto, dei vari subelementi. Nel caso di produzione ricombinante, le sequenze di codifica del legame *cro* con le sequenze di unità di riconoscimento di acido nucleico per formare i TBA sono vantaggiose poiché non soltanto *cro* agisce come sequenze di assemblaggio nel controllo, ma agisce pure per dirigere l'opportuna ripiegatura degli elementi di riconoscimento dell'acido nucleico. Sequenze esemplificative per controlli sono forniti in questa sede come SEQ ID N.: 104-108. Inoltre, nel caso in cui strutture di ordine superiore comprendenti siti di legame multiplo siano desiderate, come nel TBA di NF-kB/NF.kB/SP1/SP1/SP1 pentamero, l'opportuno progetto delle sequenze di asimmetria consente la realizzazione di tali strutture.

Nel modo suddetto, si preparano TBA che si legano ai loro siti leganti parenti con alta affinità. Per esempio, i componenti di legame del DNA di NF-kB dei TBA di Figura 10 si prevede si leghino a HN-LTR con un'affinità tra circa 10^{-8} e 10^{-12} molare. Le sequenze utili come unità di riconoscimento di DNA sono fornite come SEQ ID N.: 63-71, 73-84, 93-98 e 104-108 e ulteriormente esemplificate in seguito.

In considerazione della descrizione precedente di assemblaggio diretto di proteine leganti di acido nucleico con l'uso di sequenze di assemblaggio e di asimmetria (o pilotaggio), gli esperti del settore comprenderanno che la presente invenzione fornisce un metodo generalmente applicabile per l'assemblaggio di strutture proteiche. La generalità di questo metodo è ulteriormente dimostrata da considerazioni, a titolo di ulteriore esempio, dell'uso dell'interazione di un anticorpo-epitopo nell'assemblaggio di strutture desiderate. A titolo di specificità, una struttura di proteina di legame del DNA può essere assemblata legando una subunità p50 di NF-kB ad un antigene, come un ormone di stimolazione di melanocita (MSH) circolarizzato (attraverso legami di disolfuro). Questa molecola pro-MSH può quindi essere legata mediante un anticorpo anti-MSH per provvedere un nuovo gruppo legante di acido nucleico, con l'antigene e l'anticorpo che agiscono come sequenze di assemblaggio.

La struttura modulare fornita nella Figura 9 rivela che una grande varietà di TBA può essere assemblata usando differenti combinazioni di componenti. Così, realizzazioni rappresentative di questa struttura generale vengono fornite come SEQ ID N.: 109-116.

7. Gruppi leganti booster (BBA) e loro preparazione. Un BBA può essere qualsiasi sostanza che lega un particolare BBR formato per ibridazione di particolari PNA e BNA, compreso quando BNA multipli (fino a e compreso "n" BNA, cioè BNA_n , in cui "n" è teoricamente $0-\infty$, ma praticamente è tra 1 e 100) vengono polimerizzati su PNA per l'amplificazione di segnale, purché BBA possa avere almeno i seguenti attributi:

(a) Il BBA deve legare le BBR in modo che sia altamente specifico per la BBR che interessa. Quindi, il BBA deve discriminare tra le BBR presenti nell'ibrido PNA-BNA e simili sequenze duplex negli ibridi BNA-CNA o altri CNA. Così, quando anche un disaccoppiamento di una singola base o differenze conformazionali con o senza disaccoppiamento delle basi si presentano nella produzione di $PNA-BNA_n$ o $PNA-BNA_n-HNA$ come ibridi, il BBA deve legare l'ibrido con avidità sufficientemente bassa tale che, dopo lavaggio del complesso TBA-TNA-PNA- BNA_n , il BBA venga spostato dalle sequenze di CNA ma non le sequenze BBR.

(b) Il BBA deve legarsi avidamente alle BBR. Le affinità di legame nel campo da 10^{-5} a circa 10^{-9} o più sono generalmente considerate sufficienti.

Esempi di BBA comprendono, senza essere limitati a queste, *cro*, e inoltre la proteina repressore del

batteriofago lambda, CL. Si veda inoltre il Brevetto U.S. n. 4.556.643, che suggerisce altre sequenze di DNA e proteine di legame specifico come repressori, istoni, enzimi modificatori del DNA e proteine di attivazione del gene catabolita. Si veda pure EP 0 453 301, che suggerisce una moltitudine di proteine di legame specifico della sequenza nucleotidica (NSSBP) come repressore di tetraciclina, il repressore lac e il repressore di triptofano. Ciascuno di questi BBA è stato riconosciuto nella tecnica come legante in particolare di sequenze di acido nucleico note e le affinità di queste interazioni sono note. Naturalmente, il procedimento della presente invenzione non è limitato all'uso di questi BBA noti. Dalla presente descrizione, chi ha un'ordinaria conoscenza può facilmente applicare l'uso dei nuovi BBA che esibiscono almeno gli attributi necessari suddetti al presente procedimento.

Esempi di nuovi BBA utili secondo questo aspetto dell'invenzione comprendono nuove proteine basate sul motivo di un DNA o RNA noto oppure una proteina di legame DNA:RNA quale *cro* o la proteina repressore λ CI. Preferibilmente tali modifiche vengono apportate per migliorare la manipolazione di questi componenti dell'invenzione. Può essere quindi desiderabile ag-

giungere un'elevata concentrazione di *cro* ad un saggio. Una delle qualità negative di *cro* è che a elevate concentrazioni il legame di *cro* al suo DNA bersaglio viene in competizione con le interazioni *cro-cro*. Così, per esempio, si deve produrre un *cro* controllato o mutato che non presenti questi inconvenienti. Esempi di tali controlli alterati sono le SEQ ID N.: 105-106 e 108. Metodi noti nella tecnica, come produzione di nuove proteine leganti bersaglio con l'uso di varie popolazioni di acidi nucleici e selezione di legame del batteriofago a bersagli particolari prescelti (cioè la cosiddetta tecnologia di visualizzazione del fago, si veda la descrizione precedente per la produzione di nuovi TBA), possono venire adottati per produrre tali nuovi BBA nonché i summenzionati nuovi TBA.

Quando BBA è una proteina o un complesso di proteine, si comprenderà che uno qualsiasi di vari metodi di routine nella tecnica può venire usato per produrre BBA. Il BBA può venire isolato dal suo ambiente naturale, o, se questo non è pratico, prodotto mediante le tecniche standard di biologia molecolare. Così, per esempio, la sequenza della proteina *cro* è nota e qualsiasi clone molecolare di batteriofago lambda può venire usato per ottenere opportuni acidi

nucleici che codificano *cro* per la sua produzione ricombinante. Inoltre, i TBA descritti in questa sede possono venire usati come BBA, purché si usino TBA differenti per legare TBR e BBR.

8. Uso di BBA e BBR per localizzare e amplificare la localizzazione dei complessi PNA-TNA-TBA (vedi Figura 8). In una realizzazione della presente invenzione, il legame altamente specifico e estremamente stretto di TBA formato dai componenti di legame di acido nucleico, viene usato per produrre un saggio sandwich di acido nucleico amplificabile. Secondo un aspetto della realizzazione, si riveste un supporto solido con un primo TBA creando un TBA immobilizzato. Nella soluzione si portano a contatto un PNA ed un TNA in condizioni ibridanti e quindi si portano a contatto con il TBA immobilizzato. Soltanto le interazioni PNA-TNA che formano lo specifico TBR riconosciuto dal TBA immobilizzato vengono mantenute dopo lavaggio della superficie solida che lega il complesso TBA-TBR.

La rivelazione del TBR legato viene eseguita attraverso il legame di acidi nucleici booster, BNA, alle 1/2 BBR presenti su PNA in condizioni ibridanti. In questo modo, anche se soltanto un singolo complesso TBA-TBR è legato a TBA immobilizzato, un grande

segnale amplificato può essere ottenuto mediante polimerizzazione di BNA multiplo su TNA immobilizzato. Ciascun BNA che si lega a TNA forma una BBR che può essere legata mediante BBA che, come i TBA immobilizzati sulla superficie solida, possono venire scelti per il loro legame molto stretto e specifico a particolari strutture di acido nucleico. Così, secondo questa realizzazione, il TBA immobilizzato può contenere la porzione legante di DNA di NF-kB, che si lega molto specificamente e strettamente ai siti di legame di NF-kB formati per ibridazione di TNA e PNA, per ottenere tale sito. Poiché è ben noto che vi sono siti di legame NF-kB sia nel genoma umano normale che nelle ripetizioni del terminale lungo del virus dell'immunodeficienza umana (HIV), questa invenzione provvede un metodo per discriminare tra i siti umani "normali" ed i siti presenti in cellule per effetto dell'infezione da HIV. Quindi, in una prova prevista per determinare la presenza o l'assenza di DNA di HIV in un campione di DNA umano, i siti di legame di NF-kB di HIV possono essere osservati come TNA, e i normali siti di legame di NF-kB umani possono essere osservati come CNA. Secondo il procedimento della presente invenzione, la discriminazione tra questi TNA e CNA viene eseguita avvantaggiandosi del fatto che in

LTR di HIV vi sono due siti di legame di NF-kB, seguiti da 3 siti SPI (si veda per esempio Koken *et al.* [1992] *Virology* 191:968-972), mentre i siti di legame cellulare di NF-kB con le stesse sequenze non sono presenti in tandem.

Nei casi in cui TNA contiene più di una 1/2 TBR e si desidera proseguire le applicazioni terapeutiche e profilattiche dei TBA, può essere desiderabile usare più di un TBA, ciascuno con la capacità di legare un TBR nel complesso TNA-PNA. In questo caso può essere vantaggioso selezionare, come componente di TBA, il legame di DNA o i domini di legame di RNA con minore affinità per la sua TBR rispetto ai domini di legame di DNA o di legame di RNA di tipo selvatico. Dato che i TBA che partecipano al legame nella TBR multipla possono essere assemblati tra di loro prima del legame alle loro TBR o assemblati tra di loro dopo il legame alle loro TBR, i singoli TBA non bloccheranno le corrispondenti TBR degli altri genomi diversi dal genoma bersaglio, a meno che le TBR siano spazialmente in grado di legare il complesso di TBA assemblato. Una caratteristica dell'assemblaggio multiplo di TBA che è specificamente rivendicata come parte dell'invenzione è che tale assemblaggio multiplo si prevede abbia un'affinità molto ridotta per

un singolo sito all'interno di TNA. Tuttavia, poiché il legame viene fortemente aumentato rispetto a uno qualsiasi dei TBA, il complesso TBA prevedibilmente non competerà per il legame di qualsiasi singola TBR con le corrispondenti proteine native *in situ*, ma legherà strettamente le sequenze nell'ibrido PNA-TNA contenente le TBR per ciascuno dei componenti di legante di acido nucleico assemblati nel TBA. Il complesso TBA può venire assemblato ed i leganti regolati nei singoli TBA in modo da permettere alle regioni leganti dell'acido nucleico presenti nel complesso di TBA di raggiungere simultaneamente e legarsi a questi bersagli.

Quando gli ibridi TNA-PNA si sono formati e sono stati portati a contatto con TBA immobilizzato, l'acido nucleico non legato viene allontanato per lavaggio dalla superficie immobilizzata e dagli ibridi immobilizzati rivelati. Questo viene eseguito in uno o più modi. Secondo un aspetto della presente invenzione, il PNA viene marcato con un OSA, come un radionucleide, perline colorate o un enzima in grado di formare un prodotto di reazione colorato. Inoltre, oltre ad avere uno o più 1/2 TBR, il PNA può anche avere almeno 1/2 BBR. Le sequenze 1/2 BBR sono scelte in modo da essere complementari alle uniche sequenze 1/2

BBR in BNA. Nella realizzazione suddescritta, per esempio, quando TBA è NF-kB e TBR formata dopo ibridazione di TNA-PNA è uno o più dei siti di legame NF-kB, le 1/2 BBR possono provvedere sequenze ibridabili (cioè complementari a filamento singolo) degli operatori lambda batteriofaghi sinistro o destro (si veda, per esempio, Ptashne [1982] *Scientific American* 247: 128-140, e le referenze ivi citate per le sequenze di questi operatori). Essi possono venire polimerizzati su PNA 1/2 BBR in modo vettoriale (vedi Figure 2 e 3) provvedendo fino a "n" BBR, e ciascuna BBR forma un sito di legame *cro*. *cro* marcato enzimaticamente, radioattivamente o in altro modo, viene portato a contatto con il complesso TBA-TNA-PNA-(BNA)_n. In questo modo si produce un segnale altamente selettivo ed amplificato. Il segnale prodotto usando un PNA avente una singola 1/2 TBR indica il successo del saggio nell'ottenere il legame TBA-TBR e la polimerizzazione dei BNA per produrre un segnale da siti cellulari (cioè da CNA). L'assenza del segnale, quando si usa un TBA dimerizzato, indica che in TNA, non vi sono LTR di HIV ne siti di legame NF-kB doppi. D'altro canto, la presenza del segnale usando NF-kB dimeri indica infezione da HIV. Come esempio specifico della descrizione precedente di questa realizzazione del-

l'invenzione si veda l'Esempio 6 che descrive un kit di test per HIV.

Naturalmente, gli esperti del settore sanno che la descrizione precedente è passibile di varie modifiche nella scelta di PNA, TNA, TBA, BNA e BBA. Inoltre, in sistemi diversi da HIV, gli esperti del settore comprenderanno che il metodo generale suddescritto può essere applicato in modo analogo. Tuttavia queste altre applicazioni possono essere più semplici che non il metodo suddescritto poiché i TBA usati possono non riconoscere qualsiasi sito cellulare normale e quindi il ricorso alla dimerizzazione o altri metodi di discriminazione tra TNA e CNA può essere meno critico. Nel progettare sonde e gruppi leganti per questi altri sistemi, l'operatore esperto sarà guidato dai seguenti principi e considerazioni.

Nella realizzazione suddescritta, l'interesse nell'uso delle porzioni leganti di DNA della proteina NF-kB come TBA e gli elementi di legame di riconoscimento NF-kB come TBR è che questi elementi formano un importante "punto di controllo" per la replicazione di HIV. È quindi noto che è necessario HN per usare NF-kB come caratteristica critica nel suo ciclo vitale replicativo. Punti di controllo simili per altri patogeni vengono scelti ed usati come basi per la ri-

velazione secondo il metodo descritto nella presente.

Dalla descrizione precedente di caratteristiche generali della presente invenzione e del suo funzionamento, un esperto della tecnica comprenderà che vi è una molteplicità di modi specifici per realizzare la presente invenzione. A titolo di esempio, il metodo della presente invenzione è adattabile ad un metodo e dispositivo che utilizza kit di test cromatografici descritti nei Brevetti U.S. n. 4.690.691 e 5.310.650 (i Brevetti '691 e '650). In questi brevetti si usa un mezzo poroso per immobilizzare un TNA o una sonda di cattura, e si usa un solvente per trasportare una fase mobile contenente un PNA marcato, se il TNA è immobilizzato, oppure il TNA, se è immobilizzata una sonda di cattura, nella "zona di cattura". Quando il TNA è stato legato nella zona di cattura, mediante immobilizzazione diretta o la sua cattura, un PNA marcato viene cromatografato attraverso la zona di cattura e qualsiasi marcatore legato viene rivelato.

Adattando la presente invenzione a tale sistema si ottiene il miglioramento dell'uso di un gruppo legante bersaglio nella zona di cattura e quindi la cattura di sequenze TBR solo perfettamente accoppiate o altre conferme di acido nucleico che rappresentano

TBR specificamente legate a TBA con i duplex TNA-PNA per effetto della discriminazione sensibile precedentemente descritta mediante TBA tra TNA e CNA.

Quando gli ibridi TNA-PNA vengono legati a TBA immobilizzato, il segnale viene amplificato aggiungendo BNA o cromatografando BNA attraverso la zona di cattura. Infine il segnale può essere ulteriormente amplificato aggiungendo BBA o cromatografando BBA marcato attraverso la zona di cattura, in questo modo la facilità di realizzazione delle fasi di analisi descritte nei Brevetti '691 e '650 viene migliorata rispetto alla presente provvedendo l'ulteriore capacità di incrementare la specificità e, mediante amplificazione, la sensibilità del metodo descritto in questi brevetti.

Gli esperti del settore comprenderanno pure che il metodo della presente invenzione è riconducibile alla realizzazione in piastre di microtitolazione oppure in sistemi automatici. L'uso di macchine che comprendono il metodo della presente invenzione rientrerà naturalmente nell'oggetto della presente descrizione e nelle rivendicazioni allegate. Così, per esempio, la presente invenzione è adattabile per l'uso in strumenti come l'analizzatore portatile Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) IMx. Il IMx viene at-

tualmente impiegato per eseguire immunosaggi di polarizzazione fluorescente (FPZA, vedi Kier [1983] *KCLA* 3:13-15) e immunosaggio con microparticelle enzimatiche (MEZA, vedi *Laboratory Medicine*, Vol. 20, n. 1, Gennaio 1989, pagine 47-49). Il metodo MEZA viene facilmente trasformato in un metodo di rivelazione di acido nucleico usando la presente invenzione con l'uso di un TBA come molecola di cattura rivestita su microparticelle sospese con dimensioni submicroniche (<0,5 µg in media). Le microparticelle rivestite con TBA vengono pipettate in una cella di reazione. Il sistema IMx pipetta quindi il campione (PNA-TNA ibridato) nella cella di reazione formando un complesso con TBA. Dopo un periodo di incubazione appropriata, la soluzione viene trasferita su una matrice di fibra di vetro inerte per la quale le particelle hanno una forte affinità e alla quale aderiscono le microparticelle. Prima o dopo la filtrazione della miscela di reazione attraverso la matrice di fibra di vetro, si aggiungono BNA e BBA, o un altro mezzo di amplificazione e rivelazione del segnale, che dipende dalla specifica formazione di ibridi TNA-PNA. Il complesso immobilizzato viene lavato ed il materiale non fissato fluisce attraverso la matrice di fibra di vetro.

I complessi legati vengono rivelati per mezzo di

BBA marcata con fosfatasi alcalina o in altro modo (radioattività, enzimaticamente, con fluorescenza). Nel caso di BBA marcati con fosfatasi alcalina, il substrato fluorescente 4-metilumbelliferilfosfato o reagente simile può venire aggiunto. In alternativa, l'enzima può venire aggirato mediante marcatura diretta di BBA con questo reagente o un reagente simile. In ogni caso la fluorescenza o altro segnale è proporzionale alla quantità di ibrido PNA-TNA presente.

La fluorescenza viene rivelata sulla superficie della matrice per mezzo di un fluorometro frontale come descritto dal produttore di IMx. Con regolazioni secondarie che possono venire apportate attraverso sperimentazione di routine per ottimizzare uno strumento come IMx per l'ibridazione di acido nucleico e le interazioni acido nucleico-TBA, la presente invenzione è completamente adattabile a analisi automatizzata di campioni di TNA.

9. Altre applicazioni diagnostiche della presente invenzione. Mentre la descrizione precedente permette l'uso della presente invenzione in un numero di modi differenti, molte altre utilizzazioni dell'invenzione verranno facilmente apprezzati, per esempio, in un sistema di ritardo della mobilità.

In questa realizzazione dell'invenzione si esegue un miglioramento del ben noto saggio di mobilità elettroforetica (EMSA) che viene realizzato come segue (vedi Figure 12a e 12b):

Un campione di DNA viene frammentato, mediante segmentazione casuale o mediante endonucleasi di restrizione specifica. Il DNA nel campione viene quindi suddiviso in due aliquote uguali e si aggiunge uno specifico TNA alla prima aliquota ma non alla seconda. La prima e la seconda aliquota vengono quindi sottoposte ad elettroforesi in una acrilammide o gel di agarosio, e il modello delle bande di DNA (visualizzate attraverso il legame del bromuro di etidio o per il fatto di essere marcate radioattivamente prima dell'elettroforesi, viene quindi confrontato per le due aliquote. Frammenti di DNA aventi siti di legame per i quali il TBA è specifico, vengono ritardati nella loro migrazione attraverso il mezzo elettroforetico. Usando l'opportuno TBA, qualsiasi numero di DNA o altre sequenze di acido nucleico può essere tracciato in questo modo.

In una modifica di EMSA precedentemente descritta, il frammento TNA viene ibridato con un PNA e frazionato in una prima dimensione. Il cDNA frazionato viene poi fatto reagire con un opportuno TBA ed il

cambiamento di mobilità del frammento di DNA viene notato. Il miglioramento del ritardo è possibile aggiungendo BBA come precedentemente descritto. (Si veda, per esempio, Vijg e la bibliografia ivi citata per tecniche note di elettroforesi bidimensionale di acido nucleico, alle quali può essere applicato il presente procedimento).

I seguenti esempi vengono forniti per guidare ulteriormente gli esperti del settore su metodi di realizzazione della presente invenzione. Le tecniche di DNA ricombinante standard, come descritte in Sambrook, Fritsch, and Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, e testi più recenti non sono descritte poiché queste fanno ora parte dell'esperienza dell'operatore ordinario.

Esempio 1 - Preparazione di PNA e marcatura di PNA

Acidi nucleici sonda, PNA, possono venire preparati mediante metodi ben noti nel campo. Così, i PNA di polinucleotidi a filamento singolo con sequenze definite possono venire preparati mediante sintesi chimica in fase solida secondo Merrifield. I PNA possono essere preparati mediante sequenze automatizzate con l'uso di tecnologia disponibile in commercio, come resine e macchine prodotte o commercializzate da

Applied Biosystems, ABI, o altri produttori. In alternativa, attraverso metodi noti di DNA ricombinante, particolari sequenze di PNA vengono sintetizzate *in vivo*, per esempio clonando un PNA duplex in un vettore che si può replicare in *E. coli*, ed è così possibile preparare grandi quantità del PNA duplex. Multimeri del PNA possono venire clonati nel vettore in modo tale che per ciascuna mole di vettore vengano liberate varie moli di PNA dopo digestione del vettore con un frammento di restrizione che affianca la sequenza di PNA. Dopo la produzione sintetica o ricombinante, i PNA vengono purificati con metodi ben noti nella tecnica come mediante elettroforesi su gel o cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). Se si produce PNA come duplex, prima dell'uso in un saggio di ibridazione per la rivelazione di sequenze di acido nucleico bersaglio, i filamenti di PNA vengono separati mediante riscaldamento o altri metodi noti nel campo.

La sequenza specifica di basi nel PNA viene scelta in modo da riflettere la sequenza che deve venire rivelata con un TNA, purché, secondo la presente invenzione, il PNA contenga una sequenza 1/2 TBR, che è una sequenza la quale, per ibridazione del PNA e TNA, forma una TBR. Poiché vi è un numero praticamen-

te illimitato di tali sequenze note nella tecnica, la scelta della sequenza di PNA è riconducibile alla selezione da parte del ricercatore esperto per qualsiasi data applicazione. La sequenza di LTR di HIV è una di tali sequenze, che per ibridazione di porzioni di codifica di PNA di LTR con TNA codificante LTR di HIV, forma TBR in grado di legare la proteina di legame di DNA di NF-kB o SP1.

Oltre alle sequenze che formano una TBR per ibridazione, il PNA può anche contenere una 1/2 BBR. Questa sequenza è una sequenza alla quale, per ibridazione con un acido nucleico ausiliario, forma una BBR in grado di legarsi a BBA. Il BBA è preferibilmente una proteina di legame di DNA avente elevata affinità per la sequenza BBR.

In questo particolare esempio, l'ibridazione tra un PNA avente una 1/2 TBR, SEQ ID N.: 4 e al terminale 3' di tale sequenza una sequenza 1/2 BBR illustrata nella SEQ ID N.: 35. Il PNA che codifica queste sequenze viene usato senza marcatura oppure marcato con un isotopo radioattivo come p^{32} , S^{35} o un isotopo simile, secondo i metodi noti nella tecnica. In alternativa, il PNA è legato ad una perlina di 0,01-10 μm , che può essere colorata per facilità di rivelazione visiva. Questo marcatore forma la OSA come de-

scritto nella descrizione. Questa sonda si ibrida con sequenze LTR di HIV per formare una TBR che si lega a NF-kB. Inoltre, il PNA si ibrida con BNA avente una 1/2 BBR complementare per formare un operatore sinistro lambda batteriofago che si lega alle proteine di repressore *cro* oppure lambda.

In modo simile a quanto precedentemente descritto, si usano PNA in cui la 1/2 TBR è una qualsiasi delle SEQ ID N.: 5 o SEQ ID N.: 7-34, e una 1/2 BBR, come SEQ ID N.: 35 o SEQ ID N.: 36 al terminale 3' o 5' di 1/2 TBR.

Esempio 2 - Preparazione e marcatura di BNA

Analogamente ai metodi descritti nell'Esempio 1 per la preparazione e la marcatura di PNA, si prepara BNA e lo si marca secondo i metodi noti della tecnica. Come descritto nel Brevetto U.S. n. 4.556.643, qui incorporato per riferimento (si veda in particolare l'Esempio 1), le sequenze di acido nucleico codificano particolari sequenze di legame di acido nucleico che possono venire prodotte in quantità mediante clonazione in un vettore replicabile. Inoltre, analogamente a tale descrizione, le sequenze 1/2 TBR e 1/2 BBR possono venire prodotte co-linearmente in questo modo, con la distinzione tuttavia che secondo la presente invenzione, la stessa sequenza 1/2 TBR

forma un sito di riconoscimento del componente di legame di acido nucleico e 1/2 BBR, mentre forma un sito di riconoscimento del componente di legame di acido nucleico, provvede pure un mezzo per amplificare il segnale prodotto per legame di 1/2 TBR alle sequenze complementari in TNA provvedendo la polimerizzazione di BNA sul PNA legato a TNA. Per permettere questo, una sequenza come la SEQ ID N.: 35, che codifica l'operatore sinistro del batteriofago lambda, viene dotata di altre sequenze come una sequenza di sovrapposizione creata ad una o entrambe le estremità del BNA per ibridazione con PNA.

Come esempio specifico, la polimerizzazione vettoriale di BNA su un TNA viene ottenuta mediante le SEQ ID N.: 40-43. In questo esempio, la SEQ ID N.: 40 codifica due 1/2 TBR che si ibrideranno con due 1/2 TBR in un TNA per formare due siti di legame NF-kB, mentre allo stesso tempo provvedono un operatore sinistro lambda batteriofago di 1/2 BBR, che inoltre è terminato al terminale 3' con il sito di riconoscimento per l'enzima di restrizione *PstI*. L'aggiunta del BNA, SEQ ID N.: 41, con 1/2 BBR complementare a 1/2 BBR su PNA, la SEQ ID N.: 40, completa la BBR mentre allo stesso tempo si completa il sito di riconoscimento di *PstI*, lasciando una sporgenza di 4 basi

per l'ibridazione con altro BNA. Quindi, la SEQ ID N.: 42 viene aggiunta e questa ha una sequenza di 4 coppie di basi al terminale 3' che è complementare alla sporgenza di 4 coppie di basi che rimane dall'ibridazione della SEQ ID N.: 40 e 41. Inoltre, la SEQ ID N.: 42 è dotata di una sequenza di cinque basi al suo terminale 5' che costituisce parte di un sito di riconoscimento *Bam*HI. Il polimero in crescita di BNA viene esteso ulteriormente per aggiunta di BNA della SEQ ID N.: 43, che è complementare alla SEQ ID N.: 42, completando la BBR mentre allo stesso tempo si completa il sito di riconoscimento *Bam*HI e si lascia un prolungamento a 4 basi che può essere ulteriormente ibridato con BNA avente sequenze complementari. In questo modo, il BNA può venire ibridato estensivamente così da amplificare fortemente il segnale di un singolo evento di ibridazione PNA-TNA.

Come con i PNA descritti nell'Esempio 1 i BNA possono venire usati in forma non marcata o possono venire marcati con metodi noti nella tecnica descritti nell'Esempio 1. Si comprenderà pure che, invece di produrre il polimero BNA mediante l'aggiunta sequenziale di BNA al complesso PNA-TNA, il polimero BNA può venire preformato ed aggiunto direttamente al complesso PNA-TNA. Un metodo semplice per preformare

tale polimero BNA comprende la produzione ricombinante di un vettore in cui vengono forniti multimeri di BNA con un sito di restrizione unico ad entrambe le estremità del polimero. Questo polimero di BNA contenente BBR multiple viene staccato dal vettore ed ibridato ad una 1/2 BBR a filamento singolo rimanente nel PNA dopo ibridazione del PNA e del TNA. Questo viene eseguito provvedendo una sequenza a filamento singolo nel PNA complementare ad una sporgenza prodotta dal polimero BNA quando viene staccato dal vettore di produzione.

Esempio 3 - Produzione di HNA e loro uso per chiudere i polimeri BNA

Gli HNA della presente invenzione vengono prodotti secondo i procedimenti noti nella tecnica per la produzione di polinucleotidi, come descritto negli Esempi 1 e 2 per PNA e BNA. Nella produzione di HNA, tuttavia, la sequenza di HNA è specificamente progettata in modo che una porzione sostanziale di HNA formi un palindromo autocomplementare per ottenere una forcina, lasciando allo stesso tempo in forma di filamento singolo un numero di basi sufficienti a potersi ibridare con sequenze a filamento singolo nella catena in crescita di BNA descritta nell'Esempio 2.

In questo esempio un HNA della SEQ ID N.: 44

viene fornito per chiudere il prolungamento di BNA su PNA nell'Esempio 2 dopo l'aggiunta di BNA, SEQ ID N.: 43. Questo viene eseguito poiché la SEQ ID N.: 44, mentre ha una sequenza palindroma che forma una forcina stabile, ha pure una sequenza al terminale 5' di HNA che completa la sequenza *Bam*HI formata per ibridazione della SEQ ID N.: 42 e della SEQ ID N.: 43. Naturalmente, la terminazione del polimero dopo l'aggiunta di soli tre BNA ha lo scopo di semplicità nel dimostrare l'invenzione. Come precedentemente descritto, questa polimerizzazione può essere proseguita in modo praticamente indefinito per amplificare il segnale dell'evento di ibridazione PNA-TNA. Quando HNA si ibrida alla catena di BNA in crescita, il polimero viene chiuso e non è più possibile alcun prolungamento del polimero.

Esempio 4 - Preparazione di TBA e BBA, loro marcatura e immobilizzazione

I TBA e BBA che possono venire usati secondo la presente invenzione comprendono qualsiasi sostanza che possa specificamente legarsi alle TBR e BBR formate per ibridazione di PNA, TNA e BNA. L'uso di proteine di legame di DNA costituisce un esempio di tali sostanze.

Per questo esempio il TBA è il dimerico della por-

zione legante di DNA di p50, e BBA è la proteina *cro* lambda. Queste proteine possono venire prodotte secondo metodi noti nel campo. I geni per entrambe queste proteine sono stati clonati. Così, queste proteine vengono prodotte in modo ricombinante e purificate secondo i metodi noti nella tecnica. Inoltre queste proteine sono marcate con un radioisotopo, come iodio radioattivo, o con un enzima, come beta-galattosidasi o perossidasi di barbaforte, o con un colorante fluorescente come fluoresceina o rodamina, secondo i metodi ben noti nella tecnica. Inoltre, uno o entrambi TBA e BBA possono venire immobilizzati su una superficie solida come la superficie di una piastra di microtitolazione o la superficie di una perlina, come una perlina colorata con diametro qualsiasi da 0,01 a 10 µm. I marcatori di TBA e BBA possono essere uguali o diversi.

In questo esempio, il TBA contenente il dominio di legame del DNA p50 dimerico viene marcato con rodamina, mentre il BBA, *cro* viene marcato con fluoresceina. Quindi, dopo ibridazione di PNA, TNA, BNA e HNA come descritto nella presente descrizione di brevetto e gli esempi precedenti e seguenti, gli ibridi di acido nucleico, se formati, vengono portati a contatto con l'eccesso di TBA marcato e *cro*. La fluore-

scenza di questi marcatori viene misurata con metodi noti e la rivelazione di entrambi i segnali è indicativa della presenza di sequenze 1/2 TBR nel TNA. Il segnale differenziale prodotto mediante la fluorescenza di NF-kB e *cro* è una misura del grado al quale la polimerizzazione di BNA sull'ibrido PNA-TBA è sfociata nell'amplificazione del segnale. L'amplificazione da 1 a oltre 1.000 volte è prevista secondo il procedimento dell'invenzione.

Esempio 5 - Ibridazione di due PNA con un TNA e discriminazione tra un TNA ed un CNA

I PNA, PNA1, SEQ ID N.: 40, e PNA2, SEQ ID N.: 45, vengono usati in eccesso molare di circa 10 volte rispetto alla concentrazione di TNA in un campione di prova. Per questo esempio, un LTR duplex isolato di HIV, in cui un filamento del quale ha la SEQ ID N.: 37, mostrata in Figura 7, e l'altro filamento del quale è complementare alla sequenza mostrata in Figura 7, viene usato come TNA. Un CNA isolato duplex viene pure usato in questo esempio, un filamento del quale ha la stessa SEQ ID N.: 37, salvo il fatto che il primo sito di legame NF-kB mostrato in Figura 7, al centro del sito di legame, posizione 1 in Figura 7, invece di una "T" presenta una "A", il filamento complementare del quale non è quindi accoppiato con

il PNA della SEQ ID N.: 40 in tale posizione.

SEQ ID N.: 40 e la SEQ ID N.: 45 vengono entrambe aggiunte a reazioni separate, la prima contenente il suddetto TNA e la seconda contenente il suddetto CNA. I campioni vengono solubilizzati in un tampone di ibridazione adatto, come Tris 10 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM. I campioni vengono riscaldati a circa 90°C per circa 5 minuti per separare i filamenti dei TNA duplex e dei CNA nei campioni, quindi i campioni vengono lasciati raffreddare per permettere la riassociazione dei filamenti di PNA, TNA e CNA.

Quando l'ibridazione è completata, il che può venire determinato con metodi noti come calcolando il $t_{1/2}$ in base alla composizione di basi e alla temperatura di riassociazione secondo metodi noti, il PNA della SEQ ID N.: 40 viene polimerizzato per aggiunta di BNA come nell'Esempio 2 e la sonda di PNA2 della SEQ ID N.: 45 viene polimerizzata con BNA partendo con la sovrapposizione del sito di riconoscimento Sph1. Dopo aggiunta dei BNA ed un breve periodo di ibridazione, i campioni separati vengono aggiunti alle perline rivestite con NF-kB immobilizzato covalentemente, e NF-kB viene lasciato legare a qualsiasi TBR formata nei campioni di TNA e CNA. Dopo circa 15 minuti di legame i campioni vengono lavati due volte

con circa 3 volumi di tampone di lavaggio appropriato, come Tris 10 mM, pH 7,5, cloruro di sodio 100 mM, o un altro tampone predeterminato per non interferire con NF-kB, oppure un'attività di legame della proteina di repressore del batteriofago lambda CI. Dopo ciascun lavaggio le perline vengono lasciate depositare per gravità o con una breve centrifugazione. Questo rimuove qualsiasi acido nucleico che non abbia un sito di legame NF-kB perfetto formato per ibridazione delle sequenze di PNA1 e TNA.

Dopo il lavaggio finale la proteina di repressione CI del batteriofago lambda marcata con un isotopo radioattivo, per esempio con iodio radioattivo, oppure marcata con un enzima, come perossidasi di barbaforte, con perline colorate o con un marcatore fluorescente, viene aggiunta a ciascun campione. I campioni vengono poi lavati varie volte (circa 3) con vari volumi (circa 2) di un tampone di lavaggio appropriato come Tris 10 mM, pH 7,5, cloruro di sodio 100 mM, o un altro tampone predeterminato per non interferire con NF-kB oppure con attività di legame della proteina del repressore CI del batteriofago lambda. Dopo ciascun lavaggio, le perline vengono lasciate depositare per gravità o con una breve centrifugazione. Dopo l'ultima centrifugazione o decanta-

zione, il marcatore legato viene quantificato mediante rivelazione dell'attività della radioattività legata, del colore formato in un saggio enzimatico, del colore delle perline legate, o la rivelazione della fluorescenza. In alternativa si può aggiungere un anticorpo anti-CI ed eseguire un immunosaggio sandwich legato ad enzima oppure un radioimmunosaggio per rivelare il repressore legato. Inoltre, come controllo negativo (fondo) tutte le manipolazioni precedenti vengono eseguite in tandem con un campione in cui si usano perline che non hanno NF-kB immobilizzato.

Come risultato del saggio precedente, i campioni contenenti il controllo e CNA hanno bassi segnali simili mentre il campione contenente TNA ha un segnale nettamente al di sopra del fondo.

Esempio 6 - Kit di prova per la rivelazione di HIV

A. Contenuti del kit:

1. Piastra di microtitolazione.
2. Soluzione a 1 mg/ml di NF-kB prodotto in modo ricombinante in soluzione salina tamponata con tris.
3. Provetta contenente PNA di HIV a filamento singolo (una miscela di oligonucleotidi premiscelati codificante due siti di legame NF-kB 1/2, cioè una miscela delle SEQ ID N.: 7 e 8).
4. Provetta contenente PNA genomico umano a fi-

lamento singolo, SEQ ID N.: 1.

5. Provetta di nucleasi (*PstI*).

6. Provetta di proteasi.

7. Provetta contenente BNA prepolimerizzato, 100 unità ripetute di batteriofago lambda O_R, chiuso con HNA ma con 1/2 BBR liberi disponibili per il legame a ibridi PNA-TNA.

8. Provetta di perossidasi di barbaforte (*hrp*) coniugata con *cro*.

9. Provetta di substrato colorato di *hrp*.

10. Soluzione salina tamponata con tris, 100 ml.

11. Lancetta.

12. Provette per reazione A, B, C, ciascuna contenente 250 µl di acqua distillata.

13. Contagocce di medicina.

B. Metodo di saggio:

(a) La piastra di microtitolazione (voce 1) viene rivestita con la soluzione di NF-κB prodotto in modo ricombinante (voce 2) ad una concentrazione di 1 mg/ml in soluzione salina tamponata con tris per una notte a 4°C sotto sbattimento.

(b) Tre gocce di sangue del soggetto da testare vengono ottenute pungendo un dito con la lancetta (reagente 11) e una goccia di sangue viene erogata in ciascuna delle provette A, B e C (reagente 12).

(c) In ciascuna provetta si aggiunge una goccia di soluzione di proteasi (reagente 6) con il contagocce per medicina (voce 12) e la provetta viene agitata e lasciata a riposo per 5 minuti.

(d) Una goccia di nucleasi (voce 5) viene aggiunta a ciascuna provetta A-C usando il contagocce per medicina e le provette vengono agitate e lasciate a riposo per 10 minuti.

(e) Una goccia della voce 3 viene aggiunta alla provetta A (campione di prova); una goccia della voce 4 viene aggiunta alla provetta B (controllo positivo); e una goccia di soluzione salina (voce 12) viene aggiunta alla provetta C come controllo negativo. Le provette vengono riscaldate a 50°C in acqua calda e lasciate raffreddare a temperatura ambiente per 1 h.

(f) Mentre l'ibridazione viene lasciata procedere nella fase (d), la proteina in eccesso viene aspirata dalla superficie e dalla piastra di microtitolazione, ottenuta dalla fase (a), e la piastra viene lavata con soluzione salina tamponata con tris (provetta 10).

(g) I contenuti delle provette A-C della fase (e) vengono trasferiti in 3 pozzetti di piastra per microtitolazione e lasciate a riposo per 1 h sotto sbattimento.

(h) I pozzetti di microtitolazione contenenti i contenuti delle provette A-C vengono lavati con soluzione salina tamponata con tris e svuotati.

(i) Una goccia della voce 7 viene aggiunta a ciascun pozzetto e lasciata ibridare con qualsiasi sito di 1/2 BBR legata alla piastra, per 1 h, lavando poi 3 volte con soluzione salina tamponata con tris.

(j) Una goccia della voce 8 viene aggiunta a ciascun pozzetto e si lascia che *cro* si leghi a qualsiasi BNA legato nel tempo di 10 minuti, quindi si lava 5 volte con 1 ml di soluzione salina tamponata con tris.

(k) Una goccia di hrp del substrato viene aggiunta a ciascun pozzetto e si lascia sviluppare il colore.

C. Risultati

Se i pozzetti A e B mostrano sviluppo di colore ed il pozzetto C non sviluppa colore, il test è valido ed il soggetto è stato infettato da HIV. Se soltanto il pozzetto A mostra sviluppo di colore o se il pozzetto C mostra lo sviluppo di colore il test è stato eseguito in modo non corretto e non è valido. Se i pozzetti A e C non mostrano sviluppo di colore ma lo presenta invece il pozzetto B, il test è valido e l'individuo non è infettato da HIV.

Esempio 7 - Produzione di vari nuovi TBA

Nuovi TBA per l'uso secondo la presente invenzione vengono preparati come segue:

(a) NF-kB/NF-kB (HIV-Detect I). Un acido nucleico che codifica una qualsiasi delle SEQ ID N.: 63-71 o un DNA di NF-kB simile che si lega ad una proteina viene fuso, in fase, ad una sequenza nucleotidica che codifica una sequenza di assemblaggio, come *cro*, in modo che la sequenza di riconoscimento del DNA di NF-kB viene codificata al terminale amminico o carbossilico della sequenza *cro*. Opzionalmente si provvede una sequenza legante tra la sequenza NF-kB e la sequenza *cro*. All'altro terminale di *cro* una sequenza di segnale di localizzazione nucleare, come la SEQ ID N.: 72, viene opzionalmente fornita. Inoltre, sequenze di asimmetria vengono opzionalmente fornite al terminale *cro* non utilizzato dalla sequenza di riconoscimento NF-kB. Esempi di TBA completo sono riportati in quanto segue.

(b) NF-kB/SPI (HIV-Detect II). In modo a simile a quanto descritto in (a) precedente, si prepara una sequenza di codifica ricombinante codificante un dominio di riconoscimento di NF-kB. In un costrutto separato, invece delle SEQ ID N.: 63-72, viene inclusa la sequenza di codifica per la porzione di riconosci-

mento del DNA di SP1. Tale sequenza deve codificare tutta o una parte funzionale della SEQ ID N.: 73 che è la porzione del fattore di trascrizione di SP1 che presenta il legame di DNA (si veda Kadonaga *et al.* [1987] *Cell* 51:1079-1090). Il vettore che codifica NF-kB e il vettore che codifica SP1 vengono quindi co-transfettati in un sistema di espressione appropriato come è ben noto nella tecnica. Una unità di riconoscimento di NF-kB monomera viene aggiunta per completare il dimerico di riconoscimento di NF-kB dopo l'assemblaggio delle unità di riconoscimento SP1 e NF-kB da parte del composto ausiliario. Le sequenze di asimmetria impediscono la formazione di dimeri NF-kB o SP1 e dirigono invece la formazione di eterodimeri NFkB-SP1 (si veda, HIV-Detect II), che vengono poi isolati dal sistema di espressione (cellula di mammifero o batterica) con metodi noti.

(c) SP1/SP1 TBA (HIV-Detect III). Come descritto in (b) precedente, si prepara un costrutto di TBA che codifichi SP1, tuttavia, soltanto questo costrutto viene trasferito nel sistema di espressione, e le sequenze di asimmetria che permettono la formazione dei dimeri SP1/SP1 sono incluse.

(d) SP1-TATA (HIV-Detect IV). Come descritto in (b) precedente, si produce un TBA ricombinante che

codifica SP1 e inoltre un ricombinante che codifica un TBA avente la sequenza di legame, SEQ ID N.: 74, o una sequenza simile codificante una unità di riconoscimento TATA viene preparata con sequenze di asimmetria complementari a quelle incluse nel costrutto che codifica TBA di SP1. Questi costrutti vengono co-transfettati e gli eterodimeri isolati con metodi standard, inclusa purificazione per affinità su una colonna di DNA avente le regioni leganti bersaglio SP1-TATA appropriate.

(e) SP1-E2 (HPV-Detect I). Un costrutto che codifica SP1 viene preparato come in (b) precedente. Un costrutto che codifica TBA di E2 viene preparato usando una sequenza che codifica una qualsiasi delle SEQ ID N.: 75-84 e 94-98 che sono unità di riconoscimento di DNA E2 di papillomavirus (vedi Hegde *et al.* [1992] *Nature* 359:505-512) o unità di riconoscimento simili, e viene preparato e co-trasformato o co-transfettato con un costrutto che codifica TBA di SP1. L'unità di riconoscimento monomera E2 viene aggiunta al dimero di riconoscimento E2 completo dopo l'assemblaggio dell'unità di riconoscimento E2-SP1 mediante il controllo. L'eterodimero HPV-Detect I viene isolato secondo metodi noti.

(f) E2-E2 (HPV-Detect II). Come descritto in

precedenza in (e), si prepara un costrutto che codifica TBA di E2, salvo il fatto che vengono incluse sequenze di asimmetria che permettono la formazione di dimeri E2. I dimeri espressi vengono quindi isolati con metodi noti comprendenti affinità per un sito di legame E2 dimero su una colonna di affinità di DNA.

(g) E2-TATA (HPV-Detect III). Come precedentemente descritto in (e) e (d), E2 e TATA che legano TBA vengono preparati (rispettivamente), salvo il fatto che sequenze asimmetriche vengono incluse per migliorare la formazione degli eterodimeri invece degli omodimeri. Questi costrutti vengono poi co-espressi e gli eterodimeri isolati.

(h) TATA-TATA (HPV-Detect IV). Come descritto in precedenza in (a) e (d), un costrutto codificante TBA che lega TATA viene preparato usando sequenze di asimmetria che incoraggiano la formazione di questo omodimero e quindi l'omodimero viene isolato.

(i) Altri TBA. Come descritto in precedenza per i TBA di HIV e HPV, i TBA per qualsiasi dato patogeno o stato di malattia possono venire prodotti identificando le proteine di legame di DNA specifiche e formando un costrutto di espressione con l'uso di un legante appropriato, assemblaggio e sequenze di asimmetria.

Esempio 8

In modo simile al saggio descritto nell'Esempio 5, si produce un saggio più severo usando la proteina legante duplex NF-kB-SP1 preparata secondo l'Esempio 6. Pertanto, le sonde mostrate nella Figura 7 e usate nell'Esempio 5 possono venire allungate per ridurre la distanza intersonda e quindi ridurre la flessibilità del DNA nel TNA.

Esempio 9 - Produzione di TBA di "ordine superiore"

Con l'uso appropriato di sequenze di asimmetria, si producono TBA che sono dimeri, trimeri, tetrametri, pentameri o esameri di particolari unità di riconoscimento di DNA. In questo modo si produce un TBA esamero facendo dapprima un TBA dimerico NF-kB p50 usando sequenze di asimmetria che consentono la formazione del dimerico. Inoltre, le sequenze di asimmetria consentono la tetramerizzazione del dimerico p50 con un dimerico SP1-SP1. Infine, altre sequenze di asimmetria dirigono l'esamerizzazione con un dimerico che presenta sequenze di localizzazione nucleare. Questo viene eseguito incorporando, per esempio, sequenze di asimmetria ottenute da insulina, che in natura formano esameri. Questa formazione di esamero viene diretta dalle SEQ ID N.: 85 (A) e 86 (B), 87 (A) e 88 (B), 89 (A) e 90 (B) e 91 (A) e 92 (B) (vedi Figure 13 e 14).

Per effetto dell'affinità estremamente alta per HIV-LTR che può venire generata usando un TBA multimerico, i composti aventi questa struttura e che possono venire usati per questo scopo sono indicati in questa sede come "HIV-Lock".

Un HIV-Lock ottimale è definito mediante "footprinting" (secondo metodi ben noti nella tecnica) TBA viene legato a TBR in LTR di HIV per confermare che l'affinità di legame di ciascuna proteina di legame di DNA che contribuisce alla formazione del complesso di TBA multimerico viene spostata verso il basso rispetto all'affinità per qualsiasi sequenza bersaglio naturale (come CNA) da cui l'unità di riconoscimento del legame di DNA del TBA è derivata. Qualsiasi perdita concomitante nell'affinità di legame per TBR di HIV è più che compensata per la formazione del multimerico come appresso descritto.

Vi può essere competizione tra il legame di ciascun componente TBA per la sua TBR e l'assemblaggio, attraverso le sequenze di asimmetria per formare il multimerico. Questo viene ovviato regolando i leganti tra il controllo e le sequenze di asimmetria in ciascun componente di TBA cosicché questi eventi competitivi non sono accoppiati. La riduzione risultante nella dimensionalità della diffusione (aumento della

concentrazione effettiva) per l'asimmetria di TBA e i componenti di assemblaggio portano ad una formazione efficiente del complesso multimerico.

In base all'impronta, la lunghezza e la composizione dei leganti viene regolata in modo da ottenere una discriminazione ottimale tra le sequenze di HIV bersaglio e le sequenze naturali. In questo modo, sebbene ciascun componente di TBA abbia una bassa affinità per le sequenze di CNA e TBR, il complesso multimerico avrà un'affinità estremamente alta per la TBR espansa riconosciuta dal complesso multimerico (il quadrato dell'affinità di ciascuna TBR riconosciuta da ciascun componente di TBA del TBA multimerico), pur avendo ancora bassa affinità per CNA. Nello stesso modo, altri complessi di TBA multimerici, a parte HIV-Lock, vengono preparati.

I TBA che possono venire formati in questo modo comprendono le seguenti sequenze che vengono assemblate legando le subunità di proteine o sequenze di acido nucleico che codificano queste subunità come segue:

Serie	Sequenze di legame dei gruppi
A	I+II+III
B	IV+V+ID
C	IV + III

in cui i gruppi I-V sono costituiti da sequenze scelte tra:

Gruppo	Scelto tra le sequenze
I	Una qualsiasi delle SEQ ID N.: 85-92
II	Met Ser, legato a qualsiasi delle SEQ ID N.: 104-106, ciascuna delle quali è legata alla SEQ ID N.: 99
III	SEQ ID N.: 100 legata a una qualsiasi SEQ ID N.: 75-84 o 94-98; SEQ ID N.: 101 legata alla SEQ ID N.: 74 o alla SEQ ID N.: 93; oppure SEQ ID N.: 102 legata alla SEQ ID N.: 74 o SEQ ID N.: 93; o qualsiasi tra le SEQ ID N.: 72, 103, 73 o 63-71
IV	Una qualsiasi delle SEQ ID N.: 104-106
V	SEQ ID N.: 99

Esempi specifici di tali TBA sono le SEQ ID N.: 109-116, assemblate come segue:

Serie	SEQ ID N.	SEQ. ID. di legame
A	109	85 + Met Ser + 104 + 99 + 100 + 94
A	110	85 + Met Ser + 104 + 99 + 72
A	111	86 + Met Ser + 105 + 99 + 102 + 74
A	112	86 + Met Ser + 106 + 99 + 73
A	113	89 + Met Ser + 106 + 99 + 63
C	114	106 + 64
C	115	105 + 64
B	116	106 + 99 + 73

In questo modo, scegliendo tra sequenze di asimmetria appropriate, sequenze di assemblaggio e unità di riconoscimento di DNA, si possono formare molti TBA differenti. Inoltre, serie di questi, come le SEQ ID N.: 114 e 115, verranno associate tra di loro ma dimeri delle SEQ ID N.: 114 o 115 non verranno formati per la repulsione di carica nelle sequenze di assemblaggio mutate (SEQ ID N.: 104 è *cro*; SEQ ID N.: 105 è una sequenza nuova mutata, *cro* caricata negati-

vamente, e la SEQ ID N.: 106 è una sequenza nuova mutata, cro caricato positivamente).

Naturalmente, data la sequenza di amminoacido di questi TBA, chi ha un'ordinaria esperienza può produrre cloni di acido nucleico ricombinanti che li codificano, e tali cloni ricombinanti formano naturalmente una parte integrale della presente invenzione.

Esempio 10 - Test HIV usando "HIV-LOCK"

Praticamente con lo stesso procedimento usato nell'Esempio 6, il "HIV-LOCK" prodotto secondo l'Esempio 9 viene usato come TBA, reagente 2, con risultati simili.

Esempio 11 - Test per HIV usando "HIV-LOCK" quando si analizza il sangue per la donazione

Quando la quantità di sangue da testare non è limitante, come per esempio quando si devono esaminare campioni di sangue per donazioni per eventuale contaminazione da HIV, si eseguono test simili all'Esempio 6, ma per ciascuna delle provette A-C, si pellettizzano 5 ml circa di sangue in una centrifuga da tavolo. Altri reagenti vengono impiegati nella quantità necessaria per trattare la quantità maggiore di TNA presente nel campione.

Esempio 12 - "HIV-LOCK" come agente terapeutico anti-HIV

"HIV-LOCK" prodotto secondo l'Esempio 9 viene formulato in soluzione a 1 mg/ml in liposomi ed iniettato per via intravenosa in un soggetto che è stato testato ed è risultato infettato da HIV. Una dose di circa 0,1 mg a 100 mg di "HIV-LOCK"/kg di massa corporea viene infusa nel periodo di 24 h e la concentrazione di HIV p24 nel siero del paziente viene controllata. Il trattamento viene ripetuto spesso quando è necessario, per esempio quando si verifica un aumento di p24 nel siero.

Esempio 13 - Uso di un costrutto HIV-TBA come prodotto terapeutico

Un vettore retrovirale ricombinante o simile viene usato per somministrare un costrutto codificante un TBA di legame di HIV-LTR ad un paziente infetto. Il vettore codifica un controllo, come *cro*, e le sequenze di DNA per le porzioni leganti di p50. Lo stesso vettore codifica pure un controllo su cui si ripiega il TBA di SP1. Le sequenze di asimmetria vengono fornite in modo tale che dopo la co-espressione di TBA di p50 e di SP1-TBA in una singola cellula infettata da HIV *in vivo*, si verifica un'associazione immediata tra questi TBA, mentre allo stesso tempo si previene qualsiasi associazione tra la porzione di legame di DNA di p50 e p50 endogeno o p65 monomeri.

Le sequenze NLS vengono pure fornite nei TBA cosicché, dopo la formazione del dimerico, il TBA si ridispone immediatamente nel nucleo della cellula e si lega specificamente alle sequenze di HIV integrate, impedendo così qualsiasi trascrizione dal luogo.

Per questo scopo è desiderabile scegliere sequenze codificanti i domini di legame di DNA in modo tale che i monomeri espressi vengano assemblati in un TBA che non si lega a sequenze umane naturali. Così, è soltanto dopo il legame dei componenti di TBA alle loro sequenze bersaglio che l'associazione tra tutti i componenti del TBA si manifesta per formare un complesso che si lega strettamente e specificamente a LTR di HIV.

Esempio 14 - Kit di test diagnostico per papillomavirus umano

Il kit diagnostico per papillomavirus umano si avvantaggia dal differenziale noto tra HPV benigno e carcinogeno per provvedere un test che indica la suscettibilità alle forme maligne in un paziente. I papillomavirus sono un gruppo di piccoli virus di DNA associati con tumori a cellule epiteliali squamose benigne nei vertebrati superiori. Almeno 27 tipi umani distinti di papillomavirus (HPV) sono stati trovati; molti di questi sono stati associati con specifi-

che lesioni cliniche. Quattro di questi, HPV-6, HPV-11, HPV-16, HPV-18 e HPV-33 sono stati associati con lesioni del tratto genitale umano. In generale, HPV-6 e HPV-11 hanno DNA che è stato trovato associato con lesioni benigne del tratto genitale. HPV-16, HPV-18 e HPV-33 sono risultati associati a lesioni premaligne e maligne e vengono trascritti in molte linee cellulari stabilite da carcinoma cervicali. HPV-16, HPV-18 e HPV-33 sono probabilmente i soli due membri di una grande serie di DNA di HPV associati con carcinoma cervicale umano maligno.

I modelli animali hanno mostrato che le lesioni da papillomavirus benigno possono progredire a lesioni maligne in presenza di co-carcinogeno. Il DNA di HPV è stato trovato in metastasi di carcinomi cervicali. Nelle lesioni cervicali maligne, il DNA di HPV è normalmente integrato nel genoma umano, ma vi possono anche essere DNA di HPV extracromosomici presenti. L'integrazione di HPV per formare il provirus normalmente porta alla disgregazione della fase di lettura aperta virale E2 (ORF). Nonostante la distruzione di ORF di E2, l'esame delle linee cellulari di vari carcinomi cervicali ha mostrato attività trascrizionale e HPV-16 e HPV-18 integrati. Quando i genomi HPV-16 che sono presenti nelle linee cellulari

del carcinoma cervicale umano SiHa e CaSki sono stati esaminati, sono risultate differenze dovute all'integrazione di HPV-16. Nella linea SiHa, il genoma singolo HPV-16 si è integrato alle basi 3.132 e 3.384, distruggendo E1 e le ORF di E2 con una delezione di 0,3 kb. Un'altra delezione di 50 coppie di basi del DNA di HPV-16 risulta in E2 e E4 che vengono fusi a OFR. La porzione 5' del DNA di HPV-16, consistente nella ORF E2 distrutta, è legata a sequenze di affiancamento destre umane continue. Inoltre, una singola guanina viene rilevata al nucleotide 1.138 nel mezzo di ORF E1. Questa addizione della coppia di basi porta alla fusione di E1a e ORF di E1b in un singolo ORF E1.

Il genoma completo di HPV-16 è disponibile presso GenBank con numero di accesso K02718; il genoma completo di HPV-33 è disponibile presso GenBank con numero di accesso M12732; il genoma completo di HPV-18 è disponibile presso GenBank con numero di accesso X05015.

Come selezione preliminare, il fatto che l'infezione HPV venga stabilita per un dato campione di biopsia cervicale mediante una semplice analisi di tipo "si/no" usando, per esempio una qualsiasi dei PNA delle SEQ ID N.: 46-53 e TBA di E2 come preceden-

temente descritto (cioè frammento di DNA che lega PNA, si immobilizza con TBA e rileva i segnali con BNA e BBA).

Quando un campione di biopsia risulta positivo per HPV, ulteriori informazioni possono essere ottenute relative alla potenziale malignità del HPV analizzando lo stato di integrazione del virus nel genoma umano.

1. Si frammenta il DNA nel campione di biopsia cervicale e si ibrida ad una sonda di bloccaggio avente la SEQ ID N.: 60. Questa sonda si legherà a tutti i frammenti del DNA che non si sono collegati al frammento da 0,3 kb.

2. Si espone il DNA nel campione di biopsia ad un PNA avente la SEQ ID N.: 61. Questa sonda si legherà soltanto a frammenti che hanno cancellato il frammento da 0,3 kb (la sonda di bloccaggio impedirà la circolarizzazione dei grandi segmenti di delezione, se presenti).

3. Si ibrida un PNA avente la SEQ ID N.: 62 con la SEQ ID N.: 41 per formare una BBR che si legherà a *cro* o al repressore λ CI come BBA, lasciando una porzione a filamento singolo in grado di ibridarsi con il sito TATA sulla SEQ ID N.: 61.

Questo si aggiunge per formare una TBR al termi-

nale 5' della delezione grande.

4. La TBR viene immobilizzata mediante un TBA avente una unità di riconoscimento del DNA della proteina di legame TATA.

5. I frammenti legati vengono rivelati aggiungendo BNA e BBA come precedentemente descritto.

La rivelazione del segnale in questo saggio indica che un frammento grande viene cancellato in HPV presente nel TNA. Poiché questa delezione è correlata con la forma maligna, questo saggio illumina il potenziale maligno dell'infezione da HPV. Questa conclusione può essere confermata eseguendo un saggio analogo basato sulla delezione del frammento di 52 coppie di basi che è pure correlato con la forma maligna indotta da HPV.

L'unità di riconoscimento TBP usata nel TBA per questo saggio può venire scelta, per esempio, da una sequenza come la SEQ ID N.: 70 o la SEQ ID N.: 93.

Esempio 15 - Produzione del HIV-LOCK™ ricombinante.

Fase 1 - Preparazione di DNA per produrre HIV-Lock™. Nella mutagenesi *in vitro* delle regioni codificanti dei componenti clonati presenti in natura di HIV-Lock™ che devono venire modificati viene eseguita con un kit MutaGene Phagemid. Il protocollo modificato comprende l'uso di un plasmide Blue-script

contenente ciascuno dei componenti di legame di HIV-Lock™. Questi vengono trasformati in cellule competenti e i fagemidi contenenti uracile vengono coltivati. DNA a filamento singolo viene estratto ed usato come stampo per il filamento mutageno. Gli oligonucleotidi contenenti le mutazioni desiderate, compresa l'incorporazione di un nuovo sito di restrizione, vengono sintetizzati e trattati con polinucleotide chinasi e ATP. Gli oligonucleotidi trattati con chinasi vengono riassociati allo stampo a filamento singolo e un filamento mutageno viene sintetizzato e legato secondo il protocollo MutaGene, ad eccezione del fatto che Sequenase 2.0 provvede la polimerasi. Le librerie vengono selezionate usando nucleotidi marcati con $g^{-32}P$ terminalmente contenenti sequenze complementari alle mutazioni introdotte e isolando il DNA plasmide e identificando i mutanti per la presenza del sito di restrizione introdotto. Le mutazioni vengono pure confermate mediante sequenziazione con un kit Sequenase. Il DNA HIV-Lock™ viene clonato nel sistema di espressione di baculovirus con un promotore polyhedron.

Fase 2 - Produzione di proteine HIV-Lock™ usando baculovirus. Cellule Sf-9 vengono coltivate fino ad una densità predeterminata (circa 1×10^6 cellu-

le/ml, fase logaritmica), infettate con il baculovirus contenente le istruzioni HIV-Lock™ e raccolte per recuperare le proteine ricombinanti compreso HIV-Lock™. Nel procedimento in scala maggiore, le colture vengono espanse da pallone a tavole rotanti e successivamente a bioreattori. Dopo l'infezione le cellule vengono raccolte a 12, 24, 36 e 48 h per la proteina. Indici di vitalità vengono monitorati per tutto il procedimento.

Fase 3 - Purificazione delle proteine HIV-Lock™.

Le proteine raccolte vengono dapprima separate dai prodotti particolati mediante passaggio in ultracentrifuga per facilitare la purificazione a valle. Il prodotto centrifugato viene filtrato sterilmente. Estratti vengono centrifugati a 40.000 giri/min a 4°C per 30 minuti e aliquote vengono immunoprecipitate con anticorpo policlonale di coniglio contro uno dei componenti di HIV-Lock™. Le proteine immunoprecipitate vengono analizzate su SDS-gel PAGE 10%.

Fase 4 - Test delle proteina HIV-Lock™ contro DNA di HIV. I saggi di spostamento della mobilità vengono realizzati usando un elemento comprendente una sonda oligonucleotidica del terminale ripetuto lungo di HIV e frammenti contenenti DNA che si lega a NFkB associati con la catena leggera kappa e regola-

zione di microglobulina. L'oligonucleotide viene riassociato al suo filamento complementare e marcato terminalmente con γ - ^{32}P ATP.

L'impronta viene eseguita combinando piccole quantità (10^{-15} M) di DNA di LTR di HIV radiomarcato con una quantità leggermente maggiore di HIV-Lock™ in un tampone a temperatura ambiente per 10 minuti. Si aggiunge ditiotreitolo prima dell'aggiunta della proteina. Si aggiunge ferro (II), EDTA, perossido di idrogeno e ascorbato sodico e la miscela di reazione viene incubata. Si aggiunge un agente bloccante ed i prodotti vengono analizzati mediante elettroforesi su gel denaturante. Questo viene fatto per differenti concentrazioni di proteine. Il gel risultante viene visualizzato con uno scanner fosfovisualizzatore e il file di immagini ad alta risoluzione risultante viene analizzato per sottrarre l'affinità di legame di HIV-Lock™ per il DNA di HIV relativo a DNA cellulare.

Il progetto multiplo e ripetute prove possono venire usati per ritrovare il legame di HIV.Lock™ e altri TBA per HIV e altri organismi. Il processo rende possibile la progettazione di gruppi di legame in modo che il gruppo legante non sia competitivo con le proteine di tipo selvatico per singoli siti di legame dei campioni genomici. Lo sviluppo di TBA per altri

organismi e TNA per sequenze con questi organismi può essere realizzato usando il metodo summenzionato. Questo metodo è valido quando si producono gruppi di legame per tutte le TBR di acido nucleico comprendenti gli ibridi DNA-DNA, DNA-RNA e RNA-RNA e combinazioni di questi ibridi.

Esempio 16 - Metodo per identificare molecole leganti di acido nucleico per la produzione di TBA e BBA secondo l'invenzione:

Nel procedimento della presente invenzione, i gruppi di legame bersaglio e i gruppi di legame ausiliari vengono assemblati mediante identificazione delle molecole leganti dell'acido nucleico, e legando le porzioni leganti dell'acido nucleico delle molecole in modo tale da ottenere TBA che discriminino tra le particolari sequenze bersaglio e anche sequenze strettamente correlate. Un procedimento per identificare le molecole leganti dell'acido nucleico comporta le fasi seguenti:

1. Prelevare un campione biologico contenente l'acido nucleico bersaglio. Questo può essere, per esempio, un estratto di organismo o di tessuto infettato con un patogeno.

2. Frammentare il campione in modo da esporre gli acidi nucleici e ridurre la complessità dimensio-

nale degli acidi nucleici presenti nel campione.

3. Portare a contatto una prima aliquota degli acidi nucleici frammentati con un mezzo tampone di controllo e portare a contatto una seconda aliquota degli acidi nucleici frammentati con il mezzo tampone di controllo contenente un profilo noto di molecole leganti di acido nucleico.

4. Analizzare le due aliquote per identificare frammenti che hanno un comportamento alterato nell'aliquota portata a contatto con le molecole leganti bersaglio rispetto all'aliquota di controllo. Questo viene ottenuto mediante elettroforesi su gel monodimensionale, elettroforesi su gel bidimensionale, cromatografia liquida ad alta prestazione, cromatografia su carta o qualsiasi altro mezzo che riveli un comportamento differente dei frammenti di acido nucleico quando vengono legati ad una molecola legante di acido nucleico rispetto a quando il frammento di acido nucleico non è legato.

5. Identificare ed isolare frammenti che presentano un comportamento alterato quando vengono portati a contatto con la molecola legante di acido nucleico e sequenziare il frammento di acido nucleico per determinare se sono presenti motivi di molecole leganti di acido nucleico noti oppure identificare diretta-

mente la molecola legante di acido nucleico legata all'acido nucleico. Quest'ultima soluzione può essere ottenuta, per esempio, portando a contatto una griglia bidimensionale di acidi nucleici sottoposti ad elettroforesi con anticorpi marcati in modo differente che si legano alle varie molecole leganti di acido nucleico.

In questo metodo motivi preferibilmente di acido nucleico vengono usati per scopi diagnostici o terapeutici in cui l'acido nucleico bersaglio ha più di una singola molecola bersaglio che si lega all'acido nucleico utilizzabile. In questo modo si può generare un gruppo legante bersaglio complesso che si avvantaggia della prossimità dei differenti motivi molecolari leganti di acido nucleico per migliorare la specificità del TBA assemblato dai singoli componenti leganti di acido nucleico identificati. Le varie porzioni leganti di acido nucleico delle molecole leganti di acido nucleico vengono poi assemblate nei TBA completi come precedentemente descritto, per esempio, per HIV-Lock™.

Esempio 17 - Metodo per identificare specifiche sequenze di RNA in un campione

Secondo i metodi e le composizioni descritte nella presente invenzione, qualsiasi sequenza di aci-

do nucleico può venire specificamente identificata. L'identificazione di RNA di HIV bersaglio in un campione viene ottenuta da un campione di sangue del paziente o altro fluido biologico o estratto che può contenere RNA di HIV, e testando la presenza dei siti leganti di TAR. Tat è un regolatore positivo di replicazione di HIV che si lega alla regione TAR di RNA di HIV. La forma pienamente attiva più piccola che si presenta in natura di HIV-Tat è di 72 amminoacidi di lunghezza, la SEQ ID N.: 118 riportata. Tat contiene almeno due domini funzionali, e l'espressione del gene transattivato dalla parte terminale ripetuta lunga di HIV (LTR di HIV). Tat si lega ad una struttura ad ansa di RNA formata da autoibridazione di sequenze in TAR, che si trova appena 5' rispetto a LTR di HIV. RNA di TAR di HIV forma una struttura di dinucleotide sporgente e due strutture ad anello sternale (Rhim et al. 1994 Virology:202, 202-211). Il Tat (SEQ ID N.: 118) si lega a questa struttura con un'avidità minore delle varianti Tat in cui Ala58 è una treonina o quando His65 è un residuo Asp. (Derse et al., 1993 Virology: 194, 530-536). L'utilizzo di questi fatti nel presente procedimento è accompagnato da:

1. Frammentare un campione biologico per esporre gli acidi nucleici e ridurre la complessità dimensio-

nale degli acidi nucleici.

2. Portare a contatto un TBA con il campione che identifica una sequenza di proteina legante ibrida TAR ed una sequenza di affiancamento prossimale nel genoma di HIV. Il TBA usato per questo scopo viene assemblato su *cro* come controllo usando Tat come molecola legante specifica di RNA di HIV. Per provvedere specificità come l'interferenza tra il sito TAR di HIV e i siti TAR strettamente correlati che possono essere presenti per altri patogeni quali citomegalovirus, il TBA ha pure un componente di anticorpo che riconosce la regione legante bersaglio ibrida DNA-RNA formata quando una sonda di acido nucleico si lega a RNA di LTR di HIV.

3. Eliminando qualsiasi "interferenza" prodotta dal legame di Tat alla regione TAR di RNA di HIV dovuta a tali contaminanti (RNA cugini) come la sequenza TAR di CMV portando a contatto la reazione con un eccesso di variante Tat (la variante Ala58 con Thr o His65 con Asp) che si legano più avidamente. In questo modo eventi di legame singolo dovuti al legame di TBA con RNA cugini trovano la competizione del campione di acido nucleico mediante la variante Tat. D'altro canto, selezionando opportunamente l'affinità del doppio legame ottenuto come risultato dell'anti-

corpo e di Tat, il TBA non viene spostato dai bersagli reali. Questo procedimento è rappresentato nella Figura 16. Secondo un altro aspetto dello stesso procedimento, il TBA può essere un TBA in cui, invece di usare una variante di Tat, si usa un anticorpo che riconosce questo segmento di acido nucleico, ed il TBA usato è un TBA a doppio anticorpo.

In una versione alternativa di questo procedimento, si può usare una sonda di acido nucleico che si ibrida con RNA di LTR di HIV. Pertanto, un segmento duplex dei siti LTR sp 1 può venire creato come parte della regione legante bersaglio. Questa regione di RNA di HIV si affianca alla regione TAR che è in 5' rispetto a LTR ma più vicina a questo. Un TBA contenente Tat e due unità di legame Sp1 viene controllato in modo da provvedere Tat che si lega a TAR e Sp1 che si lega ai siti di legame Sp1. L'amplificazione e la rivelazione vengono quindi eseguiti aggiungendo opportuni BNA, BBA e HNA. In un'altra alternativa ancora si possono impiegare PNA aventi la SEQ ID N.: 38 e la SEQ ID N.: 39 (vedi Figura 7). Si usa un TBA che contiene una o più unità leganti Sp1 ed una unità di anticorpo che si lega all'ibrido DNA-RNA prodotto dall'RNA campione e da PNA della SEQ ID N.: 38. Per amplificare il segnale si aggiungono quindi

opportuni BNA, BBA e HNA.

Naturalmente, gli esperti del settore comprenderanno che è possibile usare altre combinazioni di TBA e TNA per ottimizzare i metodi esemplificati nella presente.

Si comprenderà che le sequenze fornite in questa sede sono semplicemente esemplificative e che altre sequenze simili suggerite da queste possono essere usati nei procedimenti della presente invenzione. Si comprenderà pure che sebbene qualsiasi sequenza fornita in questa sede possa essere rappresentata linearmente, essa può venire usata in forma permutata circolare o di altro tipo e sebbene rappresentata come non antisenso, può venire usata nella forma codificante o non codificante o per legarsi alle sequenze complementari codificanti o non codificanti.

ELENCO SEQUENZE

(1) INFORMAZIONI GENERALI:

(i) RICHIEDENTE:

Nome del Richiedente: THE GENE POOL, INC.

Indirizzo: 300 Queen Anne Ave. N., Suite 392

Città: Seattle

Stato/Provincia: Washington

Nazione: Stati Uniti D'America

Codice postale/Zip: 98109-4599

Numero di telefono: (206)526-8617 Numero di fax:

(ii) TITOLO DELL'INVENZIONE: METODO DI RILEVAMENTO DI ACIDI NUCLEICI CON UNA COMPOSIZIONE DI SEQUENZE SPECIFICA.

(iii) NUMERO DI SEQUENZE: 118

(iv) INDIRIZZO CORRISPONDENZA:

(A) DESTINATARIO: Saliwanchik & Saliwanchik

(B) INDIRIZZO: 2421 N.W. 41st St., Suite A-1

(C) CITTA': Gainesville

(D) STATO: Florida

(E) NAZIONE: Stati Uniti D'America

(F) ZIP: 32606

(v) FORMA LEGGIBILE AL COMPUTER:

(A) TIPO DI MEZZO: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatibile

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: Patentin Release #1.0, Versione #1.25

(vi) DATI DOMANDA ATTUALE:

(A) NUMERO DOMANDA:

(B) DATA DEPOSITO:

(C) CLASSIFICAZIONE:

(viii) INFORMAZIONI SU PROCURATORE/AGENTE:

(A) NOME: Bencen, Gerard H

(B) NUMERO REGISTRAZIONE: 35.746

(C) NUMERO RIFERIMENTO/PRATICA: GP-100.C1

(ix) INFORMAZIONI PER TELECOMUNICAZIONE:

(A) TELEFONO: (904) 375-8100

(B) TELEFAX: (904) 372-5800

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 1:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 13 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 1:

TGGGGATTCC CCA 13 |

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 2:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 13 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 2:

AAGGGACTTT CCC 13

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 3:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 13 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 3:

AGGGGACTTT CCG 13

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 4:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 15 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 4:

GCTGGGGACT TTCCA 15

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 5:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 15 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 5:

ACAAGGGACT TTCCG 15 |

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 6:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 13 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE
N: 6:

CCGGGTTTTTCCC 13

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 7:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 27 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE
N: 7:

AAGGGACTTTCCGCTGGGGGACTTTCCA 27

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 8:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 27 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 8:

AAGGGACTTT CCGCTGGGGA CTTTCCG 27

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 9:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 26 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 9:

GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCGTGG 26

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 10:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 26 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 10:

GCTGGGGACT TTCCAGGGGA GGTGTG 26

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 11:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 26 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 11:

GCTGGGGACT TTCCGGGGAG CGTGGC 26

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 12:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 26 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 12:

GCTGGGGACT TTCCGGGGAG GCGCGG 26

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 13:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 26 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 13:

GCTGGGGACT TTCCAGAGAG GCGTGG 26

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 14:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 26 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 14:

GCTGGGGACT TTCCAGGGGA GGCGTG 26

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 15:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 26 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 15:

GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCGTGG 26

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 16:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 26 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 16:

GCTGGGGACT TTCCAGGGAG GCTGCC 26

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 17:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 33 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 17:

TTCCAGGGA GCGTGGCCT GGGCGGGACT GGG 33

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 18:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 33 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 18:

CGTGGCCTGG GCGGGACTGG GGAGTGGCGT CCC 33

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 19:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 45 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 19:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCT 45

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 20:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 46 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 20:

CAGCAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGGAGGTG TGGCCT 46

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 21:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 46 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 21:

CATCAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGGAGGTG TGGCCT 46

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 22:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 46 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE
N: 22:

CAACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGGAGGTG TGGCCT 46

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 23:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 45 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE
N: 23:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCAT 45

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 24:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 44 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 24:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC GGGGAGCGTG GCCT 44

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 25:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 44 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 25:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC GGGGAGGCGC GGCT 44

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 26:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 45 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 26:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGAGAGGCGT GGACT 45

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 27:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 46 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 27:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGGAGGCG TGGACT 46

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 28:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 46 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 28:

CTACAGGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGGGAG 46

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 29:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 43 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 29:

CTACAGGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCTG CCT 43

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 30:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 48 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 30:

CTTCCGCTG GGGACTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGA CTGGG 48

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 31:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 45 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 31:

TTCCAGGGA GGCGTGGCCT GGGCGGGACT GGGGAGTGGC GTCCC 45

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 32:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 59 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 32:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGACTGGGG 59

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 33:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 59 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 33:

TTTCCGCTGG GGACTTTCCA GGGAGGCGTG GCCTGGGCGG GACTGGGGAG TGGCGTCCC 59

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 34:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 70 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 34:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGACTGGGGA 60

GTGGCGTCCC 70

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 35:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 61 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 35:

TATCACCGCC AGTGGTATTT ATGTCAACAC CGCCAGAGAT AATTATCAC CGCAGATGGT 60

T 61

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 36:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 64 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 36:

TATCACCGCA AGGATAAAT ATCTAACACC GTGCGTGTG ACTATTTTAC CTCTGGCGGT 60

GATA 64

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 37:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 70 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 37:

CTACAAGGGA CTTTCGCTG GGGACTTTC AGGGAGGCGT GGCCTGGGCG GGACTGGGGA 60

GTGGCGTCCC 70

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 38:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 37 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 38:

CTACAAGGGA CTTTCCGCTG GGGACTTTCC AGGGAGG 37

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 39:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 22 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 39:

CGGGACTGGG GAGTGGCGTC CC 22

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 40:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 103 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 40:

CTACAAGGGA CTTCCGCTG GGGACTTCC AGGGAGGTAT CACCGCCAGT GGTATTTATG 60

TCAACACCGC CAGAGATAAT TTATCACCGC AGATGGTTCT GCA 103

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 41:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 62 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) MÅ

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 41;

GAACCATCTG CGGTGATAAA TTATCTCTGG CGGTGTTGAC ATAAATACCA CTGGCGGTGA 60

TA 62

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 42:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 71 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 42:

GATCCAACCA TCTGCGGTGA TAAATTATCT CTGCGGTGT TGACATAAT ACCACTGGCG 60

GTGATACTGC A 71

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 43:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 63 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 43:

GTATCACCGC CAGTGGTATT TATGTCAACA CCGCCAGAGA TAATTTATCA CCGCAGATGG 60

TTG 63

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 44:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 21 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 44:

GATCCGGGGG GATACCCCC G 21

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 45:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 91 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 45:

CGGGACTGGG GAGTGGCGTC CCTATCACCG CAAGGATAA ATATCTAACA CCGTGCCTGT 60

TGACTATTTT ACCTCTGGCG GTGATAGCAT G 91

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 46:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 53 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 46:

CTAAGGGCGT AACCGAAATC GGTGAACCG AAACCGGTTA GTATAAAGC AGA 53

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 47:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 54 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 47:

AAAAGGGAGT AACCGAAAAC GGTCGGGACC GAAAACGGTG TATATAAAG ATGT 54

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 48:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 54 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 48:

AGTAGGGTGT AACCGAAAGC GGTTC AACCG AAAACGGTGC ATATATAAAG CAAA 54

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 49:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 24 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 49:

GCTTCAACCG AATTCGGTTG CATG 24

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 50:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 24 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 50:

TGTGCAACCG ATTCGGTTG CCTT 24

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 51:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 24 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 51:

TATGCAACCG AAATAGGTG GGCA 24

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 52:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 24 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 52:

TGCCTAACCG TTTTCGGTTA CTTG 24

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 53:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 24 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 53:

GGACTAACCG TTTTAGGTCA TATT 24

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 54:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 52 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 54:

GACGACTATC CAGCGACCAA GATCAGAGCC AGACACCGGA AACCCCTGCC AC 52

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 55:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 53 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 55:

GACGACACGG TATCCGCTAC TCAGCTTGTT AACAGCTAC AGCACACCCC CTC 53

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 56:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 60 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 56:

GACGACGACC TGCAGACACC ACAGACACCG CCCAGCCCCT TACAAAGCTG TTCTGTGCAG 60

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 57:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 68 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 57:

CATACCAAG CCGTCGCCTT GGGCACCGAA GAAACACAAC CACTAAGTTG TTGCACAGAG 60

ACTCAGTG 68

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 58:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 77 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 58:

TAATGTAATT GATTGTAATG ACTCTATGTG CAGTACCAGT ACCGTATTCC AGCACCGTGT 60

CCGTGGGCAC CGCAAAG 77

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 59:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 80 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 59:

ACAGACAACG ATAACCGACC ACCACAAGCA GCGGCCAAAC ACCCCGCCTT GGACAATAGA 60

ACAGCACGTA CTGCAACTAA 80

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 60:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 266 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 60:

CATATGCAAT ACAATGCATT ATACAACTG GACACATATA TATATTTGTG AAGAAGCATC	60
AGTAACTGTG GTAGAGGGTC AAGTTGACTA TTATGGTTTA TATTATGTTT ATGAAGGAAT	120
ACGAACATAT TTTGTGCAGT TTAAAGATGA TGCAGAAAAA TATAGTAAAA ATAAAGTATG	180
GGAAGTTCAT GCGGGTGGTC AGGTAATATT ATGTCTTACA TCTGTGTTTA GCAGCAACGA	240
AGTATCCTCT CCTGAAATTA TTAGGC	266

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 61:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 95 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

(C) FILAMENTO: doppio

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 61:

AGGATGTATA AAAAAACATG GATATACAGT GGAAGTGCAG TTTGATGGAG ACATATGCTA	60
TTAGGCAGCA CTTGGCCAAC CACCCCGCCG CGACC	95

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 62:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 81 coppie di basi

(B) TIPO: acido nucleico

- (C) FILAMENTO: doppio
- (D) TOPOLOGIA: lineare
- (ii) TIPO MOLECOLA: cDNA
- (iii) IPOTETICA: NO
- (iv) ANTI-SENSO: NO
- (xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 62:

CATGTTTTT TATACATCCA TATCACCGCC AGTGGTATT ATGCAACAC CGCCAGAGT 60

AATTATCAC CGCAGATGGT T 81

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 63:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 322 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 63:

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

Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val Arg Met Asp Arg Thr
 245 250 255
Ala Gly cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr Leu Leu Cys Asp Lys
 260 265 270
Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr Glu Glu Glu Glu Asn
 275 280 285
Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser Pro Thr Asp Val His
 290 295 300
Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys Tyr Lys Asp Val Asn
 305 310 315 320
Ile Thr

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 64:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 325 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 64:

Met Ala Glu Asp Asp Pro Tyr Leu Gly Arg Pro Glu Gln Met Phe His
 1 5 10 15
Leu Asp Pro Ser Leu Thr His Thr Ile Phe Asn Pro Glu Val Phe Gln
 20 25 30
Pro Gln Met Ala Leu Pro Thr Ala Asp Gly Pro Tyr Leu Gln Ile Leu
 35 40 45
Glu Gln Pro Lys Gln Arg Gly Phe Arg Phe Arg Tyr Val Cys Glu Gly
 50 55 60

Pro Ser His Gly Gly Leu Pro Gly Ala Ser Ser Glu Lys Asn Lys Lys
 65 70 75 80
 Ser Tyr Pro Gln Val Lys Ile Cys Asn Tyr Val Gly Pro Ala Lys Val
 85 90 95
 Ile Val Gln Leu Val Thr Asn Gly Lys Asn Ile His Leu His Ala His
 100 105 110
 Ser Leu Val Gly Lys His Cys Glu Asp Gly Ile Cys Thr Val Thr Ala
 115 120 125
 Gly Pro Glu Asp Cys Val His Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile Leu His
 130 135 140
 Val Thr Lys Lys Lys Val Phe Glu Thr Leu Glu Ala Arg Met Thr Glu
 145 150 155 160
 Ala Cys Ile Arg Gly Tyr Asn Pro Gly Leu Leu Val His Pro Asp Leu
 165 170 175
 Ala Tyr Leu Gln Ala Glu Gly Gly Gly Asp Arg Gln Leu Gly Asp Arg
 180 185 190
 Glu Lys Glu Leu Ile Arg Gln Ala Ala Leu Gln Gln Thr Lys Glu Met
 195 200 205
 Asp Leu Ser Val Val Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro Asp Ser
 210 215 220
 Thr Gly Ser Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp Ala Ile
 225 230 235 240
 Tyr Asp Ser Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val Arg Met
 245 250 255
 Asp Arg Thr Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr Leu Leu
 260 265 270
 Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr Glu Glu
 275 280 285
 Glu Glu Asn Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser Pro Thr
 290 295 300
 Asp Val His Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys Tyr Lys
 305 310 315 320
 Asp Ile Asn Ile Thr
 325

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 65:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

- (A) LUNGHEZZA: 268 amminoacidi
 (B) TIPO: amminoacido
 (D) TOPOLOGIA: lineare
 (ii) TIPO MOLECOLA: peptide
 (iii) IPOTETICA: NO
 (iv) ANTI-SENSO: NO
 (v) TIPO FRAMMENTO: interno
 (xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 65:

Met	Glu	Pro	Ala	Asp	Leu	Leu	Pro	Leu	Tyr	Leu	Gln	Pro	Glu	Trp	Gly	1	5	10	15
Glu	Gln	Glu	Pro	Gly	Gly	Ala	Thr	Pro	Phe	Val	Glu	Ile	Leu	Glu	Gln	20	25	30	
Pro	Lys	Gln	Arg	Gly	Met	Arg	Phe	Arg	Tyr	Lys	Cys	Glu	Gly	Arg	Ser	35	40	45	
Ala	Gly	Ser	Ile	Pro	Gly	Glu	His	Ser	Thr	Asp	Ser	Ala	Arg	Thr	His	50	55	60	
Pro	Thr	Ile	Arg	Val	Asn	His	Tyr	Arg	Gly	Pro	Gly	Arg	Val	Arg	Val	65	70	75	80
Ser	Leu	Val	Thr	Lys	Asp	Pro	Pro	His	Gly	Pro	His	Pro	His	Glu	Leu	85	90	95	
Val	Gly	Arg	His	Cys	Gln	His	Gly	Tyr	Tyr	Glu	Ala	Glu	Leu	Ser	Pro	100	105	110	
Asp	Arg	Ser	Ile	His	Ser	Phe	Gln	Asn	Leu	Gly	Ile	Gln	Cys	Val	Lys	115	120	125	
Lys	Arg	Glu	Leu	Glu	Ala	Ala	Val	Ala	Glu	Arg	Ile	Arg	Thr	Asn	Asn	130	135	140	
Asn	Pro	Phe	Asn	Val	Pro	Met	Glu	Glu	Arg	Gly	Ala	Glu	Tyr	Asp	Leu	145	150	155	160

Ser Ala Val Arg Leu Cys Phe Gln Val Trp Val Asn Gly Pro Gly Gly
 165 170 175
 Leu Cys Pro Leu Pro Pro Val Leu Ser Gln Pro Ile Tyr Asp Asn Arg
 180 185 190
 Ala Pro Ser Thr Ala Glu Leu Arg Ile Leu Pro Gly Asp Arg Asn Ser
 195 200 205
 Gly Ser Cys Gln Gly Gly Asp Glu Ile Phe Leu Leu Cys Asp Lys Val
 210 215 220
 Gln Lys Glu Asp Ile Glu Val Arg Phe Trp Ala Glu Gly Trp Glu Ala
 225 230 235 240
 Lys Gly Ser Phe Ala Ala Ala Asp Val His Arg Gln Val Ala Ile Val
 245 250 255
 Phe Arg Thr Pro Pro Phe Arg Glu Arg Ser Leu Arg
 260 265

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 66:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 263 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 66:

Met Asp Asp Leu Phe Pro Leu Ile Phe Pro Ser Glu Pro Ala Gln Ala
 1 5 10 15

Ser Gly Pro Tyr Val Glu Ile Ile Glu Gln Pro Lys Gln Arg Gly Met
 20 25 30

Arg Phe Arg Tyr Lys Cys Glu Gly Arg Ser Ala Gly Ser Ile Pro Gly
 35 40 45
 Glu Arg Ser Thr Asp Thr Thr Lys Thr His Pro Thr Ile Lys Ile Asn
 50 55 60
 Gly Tyr Thr Gly Pro Gly Thr Val Arg Ile Ser Leu Val Thr Lys Asp
 65 70 75 80
 Pro Pro His Arg Pro His Pro His Glu Leu Val Gly Lys Asp Cys Arg
 85 90 95
 Asp Gly Tyr Tyr Glu Ala Asp Leu Cys Pro Asp Arg Ser Ile His Ser
 100 105 110
 Phe Gln Asn Leu Gly Ile Gln Cys Val Lys Lys Arg Asp Leu Glu Gln
 115 120 125
 Ala Ile Ser Gln Arg Ile Gln Thr Asn Asn Asn Pro Phe His Val Pro
 130 135 140
 Ile Glu Glu Gln Arg Gly Asp Tyr Asp Leu Asn Ala Val Arg Leu Cys
 145 150 155 160
 Phe Gln Val Thr Val Arg Asp Pro Ala Gly Arg Pro Leu Leu Leu Thr
 165 170 175
 Pro Val Leu Ser His Pro Ile Phe Asp Asn Arg Ala Pro Asn Thr Ala
 180 185 190
 Glu Leu Lys Ile Cys Arg Val Asn Arg Asn Ser Gly Ser Cys Leu Gly
 195 200 205
 Gly Asp Glu Ile Phe Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Glu Asp Ile
 210 215 220
 Glu Val Tyr Phe Thr Gly Pro Gly Trp Glu Ala Arg Gly Ser Phe Ser
 225 230 235 240
 Gln Ala Asp Val His Arg Gln Val Ala Ile Val Phe Arg Thr Pro Pro
 245 250 255
 Tyr Ala Asp Pro Ser Leu Gln
 260

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 67:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 263 amminoacidi

- (B) TIPO: amminoacido
- (D) TOPOLOGIA: lineare
- (ii) TIPO MOLECOLA: peptide
- (iii) IPOTETICA: NO
- (iv) ANTI-SENSO: NO
- (v) TIPO FRAMMENTO: interno
- (xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 67:

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

Glu Leu Lys Ile Cys Arg Val Asn Arg Asn Ser Gly Ser Cys Leu Gly
 195 200 205
Gly Asp Glu Ile Phe Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Glu Asp Ile
 210 215 220
Glu Val Tyr Phe Thr Gly Pro Gly Trp Glu Ala Arg Gly Ser Phe Ser
 225 230 235 240
Gln Ala Asp Val His Arg Gln Val Ala Ile Val Phe Arg Thr Pro Pro
 245 250 255
Tyr Ala Asp Pro Ser Leu Gln
 260

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 68:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 299 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 68:

Met Phe Pro Asn Gln Asn Asn Gly Ala Ala Pro Gly Gln Gly Pro Ala
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Gln Gln Ser Leu Asn Tyr Asn Gly Leu Pro Ala Gln Gln
 20 25 30
 Gln Gln Gln Leu Ala Gln Ser Thr Lys Asn Val Arg Lys Lys Pro Tyr
 35 40 45
 Val Lys Ile Thr Glu Gln Pro Ala Gly Lys Ala Leu Arg Phe Arg Tyr
 50 55 60
 Glu Cys Glu Gly Arg Ser Ala Gly Ser Ile Pro Gly Val Asn Ser Thr
 65 70 75 80
 Pro Glu Asn Lys Thr Tyr Pro Thr Ile Glu Ile Val Gly Tyr Lys Gly
 85 90 95
 Arg Ala Val Val Val Val Ser Cys Val Thr Lys Asp Thr Pro Tyr Arg
 100 105 110
 Pro His Pro His Asn Leu Val Gly Lys Glu Gly Cys Lys Lys Gly Val
 115 120 125
 Cys Thr Leu Glu Ile Asn Ser Glu Thr Met Arg Ala Val Phe Ser Asn
 130 135 140
 Leu Gly Ile Gln Cys Val Lys Lys Lys Asp Ile Glu Ala Ala Leu Lys
 145 150 155 160
 Ala Arg Glu Glu Ile Arg Val Asp Pro Phe Lys Thr Gly Phe Ser His
 165 170 175
 Arg Phe Gln Pro Ser Ser Ile Asp Leu Asn Ser Val Arg Leu Cys Phe
 180 185 190
 Gln Val Phe Met Glu Ser Glu Gln Lys Gly Arg Phe Thr Ser Pro Leu
 195 200 205
 Pro Pro Val Val Ser Glu Pro Ile Phe Asp Lys Lys Ala Met Ser Asp
 210 215 220
 Leu Val Ile Cys Arg Leu Cys Ser Cys Ser Ala Thr Val Phe Gly Asn
 225 230 235 240
 Thr Gln Ile Ile Leu Leu Cys Glu Lys Val Ala Lys Glu Asp Ile Ser
 245 250 255

Met Asp Phe Leu Thr Asn Leu Arg Phe Thr Glu Gly Ile Ser Glu Pro
 1 5 10 15
 Tyr Ile Glu Ile Phe Glu Gln Pro Arg Gln Arg Gly Thr Arg Phe Arg
 20 25 30
 Tyr Lys Cys Glu Gly Arg Ser Ala Gly Ser Ile Pro Gly Glu His Ser
 35 40 45
 Thr Asp Asn Asn Lys Thr Phe Pro Ser Ile Gln Ile Leu Asn Tyr Phe
 50 55 60
 Gly Lys Val Lys Ile Arg Thr Thr Leu Val Thr Lys Asn Glu Pro Tyr
 65 70 75 80
 Lys Pro His Pro His Asp Leu Val Gly Lys Gly Cys Arg Asp Gly Tyr
 85 90 95
 Tyr Glu Ala Glu Phe Gly Pro Glu Arg Gln Val Leu Ser Phe Gln Asn
 100 105 110
 Leu Gly Ile Gln Cys Val Lys Lys Lys Asp Leu Lys Glu Ser Ile Ser
 115 120 125
 Leu Arg Ile Ser Lys Lys Asn Pro Phe Asn Val Pro Glu Glu Gln Leu
 130 135 140
 His Asn Ile Asp Glu Tyr Asp Leu Asn Val Val Arg Leu Cys Phe Gln
 145 150 155 160
 Ala Phe Leu Pro Asp Glu His Gly Asn Tyr Thr Leu Ala Leu Pro Pro
 165 170 175
 Leu Ile Ser Asn Pro Ile Tyr Asp Asn Arg Ala Pro Asn Thr Ala Glu
 180 185 190
 Leu Arg Ile Cys Arg Val Asn Lys Asn Cys Gly Ser Val Lys Gly Gly
 195 200 205
 Asp Glu Ile Phe Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Glu
 210 215 220
 Val Arg Phe Val Leu Gly Asn Trp Glu Ala Lys Gly Ser Phe Ser Gln
 225 230 235 240
 Ala Asp Val His Arg Gln Val Ala Ile Val Phe Arg Thr Pro Pro Phe
 245 250 255
 Leu Gly Asp Ile Thr
 260

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 70:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 262 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 70:

Met	Asp	Phe	Leu	Thr	Asn	Leu	Arg	Phe	Thr	Glu	Gly	Ile	Ser	Glu	Pro	
1				5					10					15		
Tyr	Ile	Glu	Ile	Phe	Glu	Gln	Pro	Arg	Gln	Arg	Gly	Met	Arg	Phe	Arg	
			20					25					30			
Tyr	Lys	Cys	Glu	Gly	Arg	Ser	Ala	Gly	Ser	Ile	Pro	Gly	Glu	His	Ser	
		35					40					45				
Thr	Asp	Asn	Asn	Lys	Thr	Phe	Pro	Ser	Ile	Gln	Ile	Leu	Asn	Tyr	Phe	
	50					55					60					
Gly	Lys	Val	Lys	Ile	Arg	Thr	Thr	Leu	Val	Thr	Lys	Asn	Glu	Pro	Tyr	
65					70					75					80	
Lys	Pro	His	Pro	His	Asp	Leu	Val	Gly	Lys	Gly	Cys	Arg	Asp	Gly	Tyr	
				85					90					95		
Tyr	Glu	Ala	Glu	Phe	Gly	Pro	Glu	Arg	Gln	Val	Leu	Ser	Phe	Gln	Asn	
		100						105						110		

Leu Gly Ile Gln Cys Val Lys Lys Lys Asp Leu Lys Glu Ser Ile Ser
 115 120 125
 Leu Arg Ile Ser Lys Lys Ile Asn Pro Phe Asn Val Pro Glu Glu Gln
 130 135 140
 Leu His Asn Ile Asp Glu Tyr Asp Leu Asn Val Val Arg Leu Cys Phe
 145 150 155 160
 Gln Ala Phe Leu Pro Asp Glu His Gly Asn Tyr Thr Leu Ala Leu Pro
 165 170 175
 Pro Leu Ile Ser Asn Pro Ile Tyr Asp Asn Arg Ala Pro Asn Thr Ala
 180 185 190
 Glu Leu Arg Ile Cys Arg Val Asn Lys Asn Cys Gly Ser Val Lys Gly
 195 200 205
 Gly Asp Glu Ile Phe Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile
 210 215 220
 Glu Val Arg Phe Val Leu Gly Asn Trp Glu Ala Lys Gly Ser Phe Ser
 225 230 235 240
 Gln Ala Asp Val His Arg Gln Val Ala Ile Val Phe Arg Thr Pro Pro
 245 250 255
 Phe Leu Gly Asp Ile Thr
 260

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 71:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 314 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 71:

Met Ser Asn Lys Lys Gln Ser Asn Arg Leu Thr Glu Gln His Lys Leu
 1 5 10 15
 Ser Gln Gly Val Ile Gly Ile Phe Gly Asp Tyr Ala Lys Ala His Asp
 20 25 30
 Leu Ala Val Gly Glu Val Ser Lys Leu Val Lys Lys Ala Leu Ser Asn
 35 40 45
 Glu Tyr Pro Gln Leu Ser Phe Arg Tyr Arg Asp Ser Ile Lys Lys Thr
 50 55 60
 Glu Ile Asn Glu Ala Leu Lys Lys Ile Asp Pro Asp Leu Gly Gly Thr
 65 70 75 80
 Leu Phe Val Ser Asn Ser Ser Ile Lys Pro Asp Gly Gly Ile Val Glu
 85 90 95
 Val Lys Asp Asp Tyr Gly Glu Trp Arg Val Val Leu Val Ala Glu Ala
 100 105 110
 Lys His Gln Gly Lys Asp Ile Ile Asn Ile Arg Asn Gly Leu Leu Val
 115 120 125
 Gly Lys Arg Gly Asp Gln Asp Leu Met Ala Ala Gly Asn Ala Ile Glu
 130 135 140
 Arg Ser His Asn Ile Ser Glu Ile Ala Asn Phe Met Leu Ser Glu Ser
 145 150 155 160
 His Phe Pro Tyr Val Leu Phe Leu Glu Gly Ser Asn Phe Leu Thr Glu
 165 170 175
 Asn Ile Ser Ile Thr Arg Pro Asp Gly Arg Val Val Asn Leu Glu Tyr
 180 185 190
 Asn Ser Gly Ser Glu Ser His Phe Pro Tyr Val Leu Phe Leu Glu Gly
 195 200 205
 Ser Asn Phe Leu Thr Glu Asn Ile Ser Ile Thr Arg Pro Asp Gly Arg
 210 215 220
 Val Val Asn Leu Glu Tyr Asn Ser Gly Ile Leu Asn Arg Leu Asp Arg
 225 230 235 240
 Leu Thr Ala Ala Asn Tyr Gly Met Pro Ile Asn Ser Asn Leu Cys Ile
 245 250 255
 Asn Lys Phe Val Asn His Lys Asp Lys Ser Ile Met Leu Gln Ala Ala
 260 265 270
 Ser Ile Tyr Thr Gln Gly Asp Gly Arg Glu Trp Asp Ser Lys Ile Met
 275 280 285

Phe Glu Ile Met Phe Asp Ile Ser Thr Thr Ser Leu Arg Val Leu Gly
290 295 300

Arg Asp Leu Phe Glu Gln Leu Thr Ser Lys
305 310

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 72:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 17 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 72:

Cys Asp Thr Asp Asp Arg His Arg Ile Glu Glu Lys Arg Lys Arg Lys
1 5 10 15

Thr

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 73:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 168 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 73:

Gly Asp Pro Gly Lys Lys Lys Gln His Ile Cys His Ile Gln Gly Cys
1 5 10 15
Gly Lys Val Tyr Gly Lys Thr Ser His Leu Arg Ala His Leu Arg Trp
20 25 30
His Thr Gly Glu Arg Pro Phe Met Cys Thr Trp Ser Tyr Cys Gly Lys
35 40 45
Arg Phe Thr Arg Ser Asp Glu Leu Gln Arg His Lys Arg Thr His Thr
50 55 60
Gly Glu Lys Lys Phe Ala Cys Pro Glu Cys Pro Lys Arg Phe Met Arg
65 70 75 80
Ser Asp His Leu Ser Lys His Ile Lys Thr His Gln Asn Lys Lys Gly
85 90 95
Gly Pro Gly Val Ala Leu Ser Val Gly Thr Leu Pro Leu Asp Ser Gly
100 105 110
Ala Gly ser Glu Gly ser Gly Thr Ala Thr Pro ser Ala Leu Ile Thr
115 120 125
Thr Asn Met Val Ala Met Glu Ala Ile Cys Pro Glu Gly Ile Ala Arg
130 135 140
Leu Ala Asn Ser Gly Ile Asn Val Met Gln Val Ala Asp Leu Gln Ser
145 150 155 160
Ile Asn Ile Ser Gly Asn Gly Phe
165

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 74:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 181 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 74:

Ser Gly Ile Val Pro Gln Leu Gln Asn Ile Val Ser Thr Val Asn Leu
1 5 10 15

Gly Cys Lys Leu Asp Leu Lys Thr Ile Ala Leu Arg Ala Arg Asn Ala
20 25 30

Glu Tyr Asn Pro Lys Arg Phe Ala Ala Val Ile Met Arg Ile Arg Glu
35 40 45

Pro Arg Thr Thr Ala Leu Ile Phe Ser Ser Gly Lys Met Val Cys Thr
50 55 60

Gly Ala Lys Ser Glu Glu Gln Ser Arg Leu Ala Ala Arg Lys Tyr Ala
65 70 75 80

Arg Val Val Gln Lys Leu Gly Phe Pro Ala Lys Phe Leu Asp Phe Lys
85 90 95

Ile Gln Asn Met Val Gly Ser Cys Asp Val Lys Phe Pro Ile Arg Leu
100 105 110

Glu Gly Leu Val Leu Thr His Gln Gln Phe Ser Ser Tyr Glu Pro Glu
115 120 125

Leu Phe Pro Gly Leu Ile Tyr Arg Met Ile Lys Pro Arg Ile Val Leu
130 135 140

Leu Ile Phe Val Ser Gly Lys Val Val Leu Thr Gly Ala Lys Val Arg
145 150 155 160

Ala Glu Ile Tyr Glu Ala Phe Glu Asn Ile Tyr Pro Ile Leu Lys Gly
165 170 175

Phe Arg Lys Thr Thr
180

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 75:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 85 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

- (ii) TIPO MOLECOLA: peptide
- (iii) IPOTETICA: NO
- (iv) ANTI-SENSO: NO
- (v) TIPO FRAMMENTO: interno
- (xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 75:

Ser	Cys	Phe	Ala	Leu	Ile	Ser	Gly	Thr	Ala	Asn	Gln	Val	Lys	Cys	Tyr
1				5				10						15	
Arg	Phe	Arg	Val	Lys	Lys	Asn	His	Arg	His	Arg	Tyr	Glu	Asn	Cys	Thr
			20					25					30		
Thr	Thr	Trp	Phe	Thr	Val	Ala	Asp	Asn	Gly	Ala	Glu	Arg	Gln	Gly	Gln
		35					40					45			
Ala	Gln	Ile	Leu	Ile	Thr	Phe	Gly	Ser	Pro	Ser	Gln	Arg	Gln	Asp	Phe
	50					55					60				
Leu	Lys	His	Val	Pro	Leu	Pro	Pro	Gly	Met	Asn	Ile	Ser	Gly	Phe	Thr
65					70					75					80
Ala	Ser	Leu	Asp	Phe											
			85												

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 76:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 87 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 76:

Cys Pro Cys Leu Leu Ile Gly Thr Ser Gly Asn Gly Asn Gln Val Lys
1 5 10 15

Cys Tyr Ser Phe Arg Val Lys Arg Trp His Asp Arg Asp Lys Tyr His
20 25 30

His Thr Thr Thr Trp Trp Ala Val Gly Gly Gln Gly Ser Glu Arg Pro
35 40 45

Gly Asp Ala Thr Val Ile Val Thr Phe Lys Asp Gln Ser Gln Arg Ser
50 55 60

His Phe Leu Gln Gln Val Pro Leu Pro Pro Gly Met Ser Ala His Gly
65 70 75 80

Val Thr Met Thr Val Asp Phe
85

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 77:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 84 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 77:

Pro Pro Val Ile Cys Leu Lys Gly Gly His Asn Gln Leu Lys Cys Leu
1 5 10 15

Arg Tyr Arg Leu Lys Ser Lys His Ser Ser Leu Phe Asp Cys Ile Ser
20 25 30

Thr Thr Trp Ser Trp Val Asp Thr Thr Ser Thr Cys Arg Leu Gly Ser
35 40 45

Gly Arg Met Leu Ile Lys Phe Ala Asp Ser Glu Gln Arg Asp Lys Phe
50 55 60

Leu Ser Arg Val Pro Leu Pro Ser Thr Thr Gln Val Phe Leu Gly Asn
65 70 75 80

Phe Tyr Gly Leu

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 78:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 84 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 78:

Pro Pro Val Ile Leu Val Arg Gly Gly Ala Asn Thr Leu Lys Cys Phe
1 5 10 15

Arg Asn Arg Ala Arg Val Arg Tyr Arg Gly Leu Phe Lys Tyr Phe Ser
20 25 30

Thr Thr Trp Ser Trp Val Ala Gly Asp Ser Thr Glu Arg Leu Gly Arg
35 40 45

Ser Arg Met Leu Ile Leu Phe Thr Ser Ala Cys Gln Arg Glu Lys Pro
50 55 60

Asp Glu Thr Val Lys Tyr Pro Lys Gly Val Asp Thr Ser Tyr Gly Asn
65 70 75 80

Leu Asp Ser Leu

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 79:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 84 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

- (D) TOPOLOGIA: lineare
- (ii) TIPO MOLECOLA: peptide
- (iii) IPOTETICA: NO
- (iv) ANTI-SENSO: NO
- (v) TIPO FRAMMENTO: interno
- (xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 79:

Pro	Pro	Val	Val	Cys	Val	Lys	Gly	Gly	Ala	Asn	Gln	Leu	Lys	Cys	Leu
1				5					10					15	
Arg	Tyr	Arg	Leu	Lys	Ala	Ser	Thr	Gln	Val	Asp	Phe	Asp	Ser	Ile	Ser
			20					25					30		
Thr	Thr	Trp	His	Trp	Thr	Asp	Arg	Lys	Asn	Thr	Glu	Arg	Ile	Gly	Ser
		35					40					45			
Ala	Arg	Met	Leu	Val	Lys	Phe	Ile	Asp	Glu	Ala	Gln	Arg	Glu	Lys	Phe
	50					55					60				
Leu	Glu	Arg	Val	Ala	Leu	Pro	Arg	Ser	Val	Ser	Val	Phe	Leu	Gly	Gln
65					70					75					80
Phe	Asn	Gly	Ser												

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 80:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

- (A) LUNGHEZZA: 84 amminoacidi
- (B) TIPO: amminoacido
- (D) TOPOLOGIA: lineare

- (ii) TIPO MOLECOLA: peptide
- (iii) IPOTETICA: NO
- (iv) ANTI-SENSO: NO
- (v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 80:

Thr Pro Ile Val Gln Leu Gln Gly Asp Ser Asn Cys Leu Lys Cys Phe
1 5 10 15

Arg Tyr Arg Leu Asn Asp Lys Tyr Lys His Leu Phe Glu Leu Ala Ser
20 25 30

Ser Thr Trp His Trp Ala Ser Pro Glu Ala Pro His Lys Asn Ala Ile
35 40 45

Val Thr Leu Thr Tyr Ser Ser Glu Glu Gln Arg Gln Gln Phe Leu Asn
50 55 60

Ser Val Lys Ile Pro Pro Thr Ile Arg His Lys Val Gly Phe Met Ser
65 70 75 80

Leu His Leu Leu

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 81:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 84 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 81:

Thr Pro Ile Val Gln Phe Gln Gly Glu Ser Asn Cys Leu Lys Cys Phe
1 5 10 15

Arg Tyr Arg Leu Asn Arg Asp His Arg His Leu Phe Asp Leu Ile Ser
20 25 30

Ser Thr Trp His Trp Ala Ser Ser Lys Ala Pro His Lys His Ala Ile
35 40 45

Val Thr Val Thr Tyr Asp Ser Glu Glu Gln Arg Gln Gln Phe Leu Asp
50 55 60

Val Val Lys Ile Pro Pro Thr Ile Ser His Lys Leu Gly Phe Met Ser
65 70 75 80

Leu His Leu Leu

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 82:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 80 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 82:

Thr Pro Ile Ile His Leu Lys Gly Asp Arg Asn Ser Leu Lys Cys Leu
1 5 10 15

Arg Tyr Arg Leu Arg Lys His Ser Asp His Tyr Arg Asp Ile Ser Ser
20 25 30

Thr Trp His Trp Thr Gly Ala Gly Asn Glu Lys Thr Gly Ile Leu Thr
35 40 45

Val Thr Tyr His Ser Glu Thr Gln Arg Thr Lys Phe Leu Asn Thr Val
50 55 60

Ala Ile Pro Asp Ser Val Gln Ile Leu Val Gly Tyr Asn Thr Met Tyr
65 70 75 80

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 83:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 80 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 83:

Thr Pro Ile Val His Leu Lys Gly Asp Ala Asn Thr Leu Lys Cys Leu
1 5 10 15

Arg Tyr Arg Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr Thr Ala Val Ser Ser
20 25 30

Thr Trp His Trp Thr Gly His Asn Tyr Lys His Lys Ser Ala Ile Val
35 40 45

Thr Leu Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln Phe Leu Ser Gln
50 55 60

Val Lys Ile Pro Lys Thr Ile Thr Val Ser Thr Gly Phe Met Ser Ile
65 70 75 80

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 84:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 81 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 84:

Ala Pro Ile Val His Leu Lys Gly Glu Ser Asn Ser Leu Lys Cys Leu
1 5 10 15

Arg Tyr Arg Leu Lys Pro Tyr Asn Glu Leu Tyr Ser Ser Met Ser Ser
20 25 30

Thr Trp His Trp Thr Ser Asp Asn Lys Asn Ser Lys Asn Gly Ile Val
35 40 45

Thr Val Thr Phe Val Thr Gly Gln Gln Gln Gln Met Phe Leu Gly Thr
50 55 60

Val Lys Ile Pro Pro Thr Val Gln Ile Ser Thr Gly Phe Met Thr Leu
65 70 75 80

Val

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 85:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 21 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

- (D) TOPOLOGIA: lineare
- (ii) TIPO MOLECOLA: peptide
- (iii) IPOTETICA: NO
- (iv) ANTI-SENSO: NO
- (v) TIPO FRAMMENTO: interno
- (xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 85:

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
 1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn
 20

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 86:

- (i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:
 - (A) LUNGHEZZA: 30 amminoacidi
 - (B) TIPO: amminoacido
 - (D) TOPOLOGIA: lineare
- (ii) TIPO MOLECOLA: peptide
- (iii) IPOTETICA: NO
- (iv) ANTI-SENSO: NO
- (v) TIPO FRAMMENTO: interno
- (xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 86:

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
 20 25 30

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 87:

- (i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

- (A) LUNGHEZZA: 21 amminoacidi
 (B) TIPO: amminoacido
 (D) TOPOLOGIA: lineare
 (ii) TIPO MOLECOLA: peptide
 (iii) IPOTETICA: NO
 (iv) ANTI-SENSO: NO
 (v) TIPO FRAMMENTO: interno
 (xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 87:

Gly ile Val Glu Gln Cys Cys Ala Ser Val Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
 1 5 10 15
Glu Asn Tyr Cys Asn
 20

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 88:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

- (A) LUNGHEZZA: 30 amminoacidi
 (B) TIPO: amminoacido
 (D) TOPOLOGIA: lineare
 (ii) TIPO MOLECOLA: peptide
 (iii) IPOTETICA: NO
 (iv) ANTI-SENSO: NO
 (v) TIPO FRAMMENTO: interno
 (xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 88:

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
 1 5 10 15
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
 20 25 30

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 89:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 24 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 88:

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Ile
1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys
20

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 90:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 33 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 90:

Asp Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Ile Cys Gly Arg Glu Leu Val
1 5 10 15

Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser Thr Trp Ser Lys Arg Ser
 20 25 30

Leu

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 91:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 24 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 91:

Glu Glu Lys Met Gly Thr Ala Lys Lys Cys Cys Ala Ile Gly Cys Ser
1 5 10 15

Thr Glu Asp Phe Arg Met Val Cys
 20

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 92:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 40 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 92:

Arg Pro Asn Trp Glu Glu Arg Ser Arg Leu Cys Gly Arg Asp Leu Ile
1 5 10 15

Arg Ala Phe Ile Tyr Leu Cys Gly Gly Thr Arg Trp Thr Arg Leu Pro
20 25 30

Asn Phe Gly Asn Tyr Pro Ile Met
35 40

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 93:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 182 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 93:

Ser Gly Ile Val Pro Thr Leu Gln Asn Ile Val Ser Thr Val Asn Leu
1 5 10 15

Asp Cys Lys Leu Asp Leu Lys Ala Ile Ala Leu Gln Ala Arg Asn Ala
 20 25 30
Glu Tyr Asn Pro Lys Arg Phe Ala Ala Val Ile Met Arg Ile Arg Glu
 35 40 45
Pro Lys Thr Thr Ala Leu Ile Phe Ala Ser Gly Lys Met Val Cys Thr
 50 55 60
Gly Ala Lys Ser Glu Asp Phe Ser Lys Met Ala Ala Arg Lys Tyr Ala
 65 70 75 80
Arg Ile Val Gln Lys Leu Gly Phe Pro Ala Lys Phe Lys Asp Phe Lys
 85 90 95
Ile Gln Asn Ile Val Gly Ser Cys Asp Val Lys Phe Pro Ile Arg Leu
 100 105 110
Glu Gly Leu Ala Tyr Ser His Ala Ala Phe Ser Ser Tyr Glu Pro Glu
 115 120 125
Leu Phe Pro Gly Leu Ile Tyr Arg Met Lys Val Pro Lys Ile Val Leu
 130 135 140
Leu Ile Phe Val Ser Gly Lys Ile Val Ile Thr Gly Ala Lys Met Arg
 145 150 155 160
Asp Glu Thr Tyr Lys Ala Phe Glu Asn Ile Tyr Pro Val Leu Ser Glu
 165 170 175
Phe Arg Lys Ile Gln Gln
 180

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 94:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 84 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 94:

Asn Ser Asn Ser Thr Pro Ile Val His Leu Lys Gly Asp Ala Asn Thr
1 5 10 15

Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr Thr
20 25 30

Ala Val Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Gly His Asn Val Lys His Lys
35 40 45

Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln
50 55 60

Phe Leu Ser Gln Val Lys Ile Pro Lys Thr Ile Thr Val Ser Thr Gly
65 70 75 80

Phe Met Ser Ile

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 95:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 84 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 95:

Asn Ser Asn Thr Thr Pro Ile Val His Leu Lys Gly Asp Ala Asn Thr
1 5 10 15

Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Phe Lys Lys His Cys Thr Leu Tyr Thr
20 25 30

Ala Val Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Gly His Asn Val Lys His Lys
35 40 45

Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln
50 55 60

Phe Leu Ser Gln Val Lys Ile Pro Lys Thr Ile Thr Val Ser Thr Gly
65 70 75 80

Phe Met Ser Ile

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 96:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 83 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 96:

Ser Gly Asn Thr Thr Pro Ile Ile His Leu Lys Gly Asp Arg Asn Ser
1 5 10 15

Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Leu Arg Lys His Ser Asp His Tyr Arg
20 25 30

Asp Ile Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Gly Ala Gly Asn Glu Lys Thr
35 40 45

Gly Ile Leu Thr Val Thr Tyr His Ser Glu Thr Gln Arg Thr Lys Phe
50 55 60

Leu Asn Thr Val Ala Ile Pro Asp Ser Val Gln Ile Leu Val Gly Tyr
65 70 75 80

Met Thr Met

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 97:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

192

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

- (A) LUNGHEZZA: 84 amminoacidi
- (B) TIPO: amminoacido
- (D) TOPOLOGIA: lineare
- (ii) TIPO MOLECOLA: peptide
- (iii) IPOTETICA: NO
- (iv) ANTI-SENSO: NO
- (v) TIPO FRAMMENTO: interno
- (xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 97:

Ser Gly Asn Thr Ala Pro Ile Val His Leu Lys Gly Glu Ser Asn Ser
1 5 10 15

Leu Lys Cys Leu Arg Tyr Arg Leu Lys Pro Tyr Lys Glu Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Met Ser Ser Thr Trp His Trp Thr Ser Asp Asn Lys Asn Ser Lys
35 40 45

Asn Gly Ile Val Thr Val Thr Phe Val Thr Glu Gln Gln Gln Gln Met
50 55 60

Phe Leu Gly Thr Val Lys Ile Pro Pro Thr Val Gln Ile Ser Thr Gly
65 70 75 80

Phe Met Thr Leu

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 98:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

- (A) LUNGHEZZA: 89 amminoacidi
- (B) TIPO: amminoacido
- (D) TOPOLOGIA: lineare
- (ii) TIPO MOLECOLA: peptide
- (iii) IPOTETICA: NO
- (iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 98:

Ser Gly Asn Thr Ser Cys Phe Ala Leu Ile Ser Gly Thr Ala Asn Gln
1 5 10 15

Val Lys Cys Tyr Arg Phe Arg Val Lys Lys Asn His Arg His Arg Tyr
20 25 30

Glu Asn Cys Thr Thr Thr Trp Phe Thr Val Ala Asp Asn Gly Ala Glu
35 40 45

Arg Gln Gly Gln Ala Gln Ile Leu Ile Thr Phe Gly Ser Pro Ser Gln
50 55 60

Arg Gln Asp Phe Leu Lys His Val Pro Leu Pro Pro Gly Met Asn Ile
65 70 75 80

Ser Gly Phe Thr Ala Ser Leu Asp Phe
85

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.: 99:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 7 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: terminale-C

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 99:

Ser Asn Lys Lys Thr Thr Ala
1 5

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.:

100:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 4 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 100:

Asn Ser Asn Thr

1

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.:

101:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 4 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 101:

Ser Gly Asn Thr
1

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.:

102:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 6 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 102:

Ser Ser Gly Ser Ser Gly
1 5

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.:

103:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 15 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: interno

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 103:

Cys Tyr Pro Glu Ile Lys Asp Lys Glu Glu Val Gln Arg Lys Arg
1 5 10 15

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.:

104:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 66 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: terminale-N

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 104:

Met Glu Gln Arg Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln
1 5 10 15

Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys
20 25 30

Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly
35 40 45

Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr
50 55 60

Thr Ala
65

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.:

105:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

- (A) LUNGHEZZA: 66 amminoacidi
- (B) TIPO: amminoacido
- (D) TOPOLOGIA: lineare
- (ii) TIPO MOLECOLA: proteina
- (iii) IPOTETICA: NO
- (iv) ANTI-SENSO: NO
- (v) TIPO FRAMMENTO: terminale-N
- (xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 105:

Met Glu Gln Glu Ile Thr Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln
1 5 10 15

Thr Lys Thr Ala Lys Asp Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys
20 25 30

Ala Ile His Ala Gly Arg Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly
35 40 45

Ser Val Tyr Ala Glu Glu Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr
50 55 60

Thr Ala
65

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.:

106:

- (i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:
 - (A) LUNGHEZZA: 66 amminoacidi
 - (B) TIPO: amminoacido
 - (D) TOPOLOGIA: lineare
- (ii) TIPO MOLECOLA: proteina
- (iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: terminale-N

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 106:

Met	Arg	Gln	Arg	Ile	Thr	Leu	Lys	Asp	Tyr	Ala	Met	Arg	Phe	Gly	Gln
1				5					10					15	
Thr	Lys	Thr	Ala	Lys	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Gln	Ser	Ala	Ile	Asn	Lys
			20					25					30		
Ala	Ile	His	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile	Phe	Leu	Thr	Ile	Asn	Ala	Asp	Gly
		35					40					45			
Ser	Val	Tyr	Ala	Glu	Glu	Val	Lys	Pro	Phe	Pro	Ser	Asn	Lys	Lys	Thr
	50					55					60				
Thr	Ala														
65															

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.:

107:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 96 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: terminale-N

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 107:

```

Ser Thr Lys Lys Lys Pro Leu Thr Gln Glu Gln Leu Glu Asp Ala Arg
1      5      10      15
Arg Leu Lys Ala Ile Tyr Glu Lys Lys Lys Asn Glu Leu Gly Leu Ser
20     25     30
Gln Glu Ser Val Ala Asp Lys Met Gly Met Gly Gln Ser Gly Val Gly
35     40     45
Ala Leu Phe Asn Gly Ile Asn Ala Leu Asn Ala Tyr Asn Ala Ala Leu
50     55     60
Leu Ala Lys Ile Leu Lys Val Ser Val Glu Glu Phe Ser Pro Ser Ile
65     70     75     80
Ala Arg Glu Ile Tyr Glu Met Tyr Glu Ala Val Ser Met Glu Pro Ser
85     90     95

```

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.:

108:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

- (A) LUNGHEZZA: 96 amminoacidi
- (B) TIPO: amminoacido
- (D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: peptide

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: terminale-N

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 108:

Ser Thr Lys Lys Lys Pro Leu Thr Gln Glu Gln Leu Glu Asp Ala Arg
 1 5 10 15
 Arg Leu Lys Ala Ile Tyr Glu Lys Lys Lys Asn Glu Leu Gly Leu Ser
 20 25 30
 Gln Glu Ser Val Ala Asp Lys Met Gly Met Gly Gln Ser Gly Val Gly
 35 40 45
 Ala Leu Phe Asn Gly Ile Asn Ala Leu Asn Ala Tyr Asn Ala Ala Leu
 50 55 60
 Leu Ala Lys Ile Leu Lys Val Ser Val Glu Glu Phe Ser Pro Ser Ile
 65 70 75 80

 Ala Arg Glu Ile Tyr Glu Met Cys Glu Ala Val Ser Met Glu Pro Ser
 85 90 95

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.:

109:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 180 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: proteina

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: terminale-N

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 109:

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

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.:

110:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 113 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: proteina

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: terminale-N

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 110:

Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	Thr	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Tyr	Gln	Leu	
1				5					10					15		
Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn	Met	Ser	Met	Glu	Gln	Arg	Ile	Thr	Leu	Lys	Asp	
			20					25					30			
Tyr	Ala	Met	Arg	Phe	Gly	Gln	Thr	Lys	Thr	Ala	Lys	Asp	Leu	Gly	Val	
		35					40					45				
Tyr	Gln	Ser	Ala	Ile	Asn	Lys	Ala	Ile	His	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile	Phe	
		50				55					60					
Leu	Thr	Ile	Asn	Ala	Asp	Gly	Ser	Val	Tyr	Ala	Glu	Glu	Val	Lys	Pro	
65					70					75					80	
Phe	Pro	Ser	Asn	Lys	Lys	Thr	Thr	Ala	Ser	Asn	Lys	Lys	Thr	Thr	Ala	
				85					90						95	
Cys	Asp	Thr	Asp	Asp	Arg	His	Arg	Ile	Glu	Glu	Lys	Arg	Lys	Arg	Lys	
			100					105						110		
Thr																

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.:

111:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 292 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: proteina

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: terminale-N

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 111:

Phe	Val	Asn	Gln	His	Leu	Cys	Gly	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr
1				5					10					15	
Leu	Val	Cys	Gly	Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Thr	Met	Ser
			20					25						30	
Met	Glu	Gln	Glu	Ile	Thr	Leu	Lys	Asp	Tyr	Ala	Met	Arg	Phe	Gly	Gln
		35					40					45			
Thr	Lys	Thr	Ala	Lys	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Gln	Ser	Ala	Ile	Asn	Lys
	50					55					60				
Ala	Ile	His	Ala	Gly	Arg	Lys	Ile	Phe	Leu	Thr	Ile	Asn	Ala	Asp	Gly
65					70					75					80
Ser	Val	Tyr	Ala	Glu	Glu	Val	Lys	Pro	Phe	Pro	Ser	Asn	Lys	Lys	Thr
				85					90					95	
Thr	Ala	Ser	Asn	Lys	Lys	Thr	Thr	Ala	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser
			100					105						110	
Gly	Ile	Val	Pro	Gln	Leu	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Thr	Val	Asn	Leu	Gly
		115					120						125		
Cys	Lys	Leu	Asp	Leu	Lys	Thr	Ile	Ala	Leu	Arg	Ala	Arg	Asn	Ala	Glu
		130				135						140			

Tyr Asn Pro Lys Arg Phe Ala Ala Val Ile Met Arg Ile Arg Glu Pro
 145 150 155 160
 Arg Thr Thr Ala Leu Ile Phe Ser Ser Gly Lys Met Val Cys Thr Gly
 165 170 175
 Ala Lys Ser Glu Glu Gln Ser Arg Leu Ala Ala Arg Lys Tyr Ala Arg
 180 185 190
 Val Val Gln Lys Leu Gly Phe Pro Ala Lys Phe Leu Asp Phe Lys Ile
 195 200 205
 Gln Asn Met Val Gly Ser Cys Asp Val Lys Phe Pro Ile Arg Leu Glu
 210 215 220
 Gly Leu Val Leu Thr His Gln Gln Phe Ser Ser Tyr Glu Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Gly Leu Ile Tyr Arg Met Ile Lys Pro Arg Ile Val Leu Leu
 245 250 255
 Ile Phe Val Ser Gly Lys Val Val Leu Thr Gly Ala Lys Val Arg Ala
 260 265 270
 Glu Ile Tyr Glu Ala Phe Glu Asn Ile Tyr Pro Ile Leu Lys Gly Phe
 275 280 285
 Arg Lys Thr Thr
 290

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.:

112:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 273 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: proteina

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: terminale-N

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 112:

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

Ala Ile Cys Pro Glu Gly Ile Ala Arg Leu Ala Asn Ser Gly Ile Asn
245 250 255

Val Met Gln Val Ala Asp Leu Gln Ser Ile Asn Ile Ser Gly Asn Gly
260 265 270

Phe

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.:
113:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 421 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: proteina

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: terminale-N

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 113:

Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys Cys His Val Gly Cys Ile
1 5 10 15

Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys Met Ser Met Arg Gln Arg Ile Thr
20 25 30

Leu Lys Asp Tyr Ala Met Arg Phe Gly Gln Thr Lys Thr Ala Lys Asp
35 40 45

Leu Gly Val Tyr Gln Ser Ala Ile Asn Lys Ala Ile His Ala Gly Arg
50 55 60

Lys Ile Phe Leu Thr Ile Asn Ala Asp Gly Ser Val Tyr Ala Glu Glu
65 70 75 80

Val Lys Pro Phe Pro Ser Asn Lys Lys Thr Thr Ala Ser Asn Lys Lys
85 90 95

Thr Thr Ala Met Ala Asp Asp Asp Pro Tyr Gly Thr Gly Gln Met Phe
100 105 110

His Leu Asn Thr Ala Leu Thr His Ser Ile Phe Asn Ala Glu Leu Tyr
115 120 125

Ser Pro Glu Ile Pro Leu Ser Thr Asp Gly Pro Tyr Leu Gln Ile Leu
130 135 140

Glu Gln Pro Lys Gln Arg Gly Phe Arg Phe Arg Tyr Val Cys Glu Gly
 145 150 155 160

Pro Ser His Gly Gly Leu Pro Gly Ala Ser Ser Glu Lys Asn Lys Lys
 165 170 175

Ser Tyr Pro Gln Val Lys Ile Cys Asn Tyr Val Gly Pro Ala Lys Val
 180 185 190

Ile Val Gln Leu Val Thr Asn Gly Lys Asn Ile His Leu His Ala His
 195 200 205

Ser Leu Val Gly Lys His Cys Glu Asp Gly Val Cys Thr Val Thr Ala
 210 215 220

Gly Pro Lys Asp Met Val Val Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile Leu His
 225 230 235 240

Val Thr Lys Lys Lys Val Phe Glu Thr Leu Glu Ala Arg Met Thr Glu
 245 250 255

Ala Cys Ile Arg Gly Tyr Asn Pro Gly Leu Leu Val His Ser Asp Leu
 260 265 270

Ala Tyr Leu Gln Ala Glu Gly Gly Gly Asp Arg Gln Leu Thr Asp Arg
 275 280 285

Glu Lys Glu Ile Ile Arg Gln Ala Ala Val Gln Gln Thr Lys Glu Met
 290 295 300

Asp Leu Ser Val Val Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro Asp Ser
 305 310 315 320

Thr Gly Ser Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp Ala Ile
 325 330 335

Tyr Asp Ser Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val Arg Met
 340 345 350

Asp Arg Thr Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr Leu Leu
 355 360 365

Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr Glu Glu
 370 375 380

Glu Glu Asn Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser Pro Thr
 385 390 395 400

Asp Val His Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys Tyr Lys
 405 410 415

Asp Val Asn Ile Thr
 420

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.:
114:
(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:
 (A) LUNGHEZZA: 391 amminoacidi
 (B) TIPO: amminoacido
 (D) TOPOLOGIA: lineare
(ii) TIPO MOLECOLA: proteina
(iii) IPOTETICA: NO
(iv) ANTI-SENSO: NO
(v) TIPO FRAMMENTO: terminale-N
(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE
N: 114:

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

Thr Ala Gly Pro Glu Asp Cys Val His Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile
 195 200 205
 Leu His Val Thr Lys Lys Lys Val Phe Glu Thr Leu Glu Ala Arg Met
 210 215 220
 Thr Glu Ala Cys Ile Arg Gly Tyr Asn Pro Gly Leu Leu Val His Pro
 225 230 235 240
 Asp Leu Ala Tyr Leu Gln Ala Glu Gly Gly Gly Asp Arg Gln Leu Gly
 245 250 255
 Asp Arg Glu Lys Glu Leu Ile Arg Gln Ala Ala Leu Gln Gln Thr Lys
 260 265 270
 Glu Met Asp Leu Ser Val Val Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro
 275 280 285
 Asp Ser Thr Gly Ser Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp
 290 295 300
 Ala Ile Tyr Asp Ser Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val
 305 310 315 320
 Arg Met Asp Arg Thr Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr
 325 330 335
 Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr
 340 345 350
 Glu Glu Glu Glu Asn Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser
 355 360 365
 Pro Thr Asp Val His Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys
 370 375 380
 Tyr Lys Asp Ile Asn Ile Thr
 385 390

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.:

115:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 391 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: proteina

212

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: terminale-N

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 115:

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

Thr Ala Gly Pro Glu Asp Cys Val His Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile
 195 200 205
 Leu His Val Thr Lys Lys Lys Val Phe Glu Thr Leu Glu Ala Arg Met
 210 215 220
 Thr Glu Ala Cys Ile Arg Gly Tyr Asn Pro Gly Leu Leu Val His Pro
 225 230 235 240
 Asp Leu Ala Tyr Leu Gln Ala Glu Gly Gly Gly Asp Arg Gln Leu Gly
 245 250 255
 Asp Arg Glu Lys Glu Leu Ile Arg Gln Ala Ala Leu Gln Gln Thr Lys
 260 265 270
 Glu Met Asp Leu Ser Val Val Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro
 275 280 285
 Asp Ser Thr Gly Ser Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp
 290 295 300
 Ala Ile Tyr Asp Ser Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val
 305 310 315 320
 Arg Met Asp Arg Thr Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr
 325 330 335
 Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr
 340 345 350
 Glu Glu Glu Glu Asn Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser
 355 360 365
 Pro Thr Asp Val His Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys
 370 375 380
 Tyr Lys Asp Ile Asn Ile Thr
 385 390

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.:

116:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 241 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: proteina

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: terminale-N

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE

N: 116:

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

Phe

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.:
117:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 10 coppie di basi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: cDNA

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE
N: 117:

GGGAMTNYCC 10

(2) INFORMAZIONI PER SEQUENZA IDENTIFICAZIONE N.:
118:

(i) CARATTERISTICHE SEQUENZA:

(A) LUNGHEZZA: 72 amminoacidi

(B) TIPO: amminoacido

(D) TOPOLOGIA: lineare

(ii) TIPO MOLECOLA: proteina

(iii) IPOTETICA: NO

(iv) ANTI-SENSO: NO

(v) TIPO FRAMMENTO: terminale-N

(xi) DESCRIZIONE SEQUENZA: SEQUENZA IDENTIFICAZIONE
N: 118:

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala His Gln Asn Ser Gln Thr
50 55 60

His Gln Ala Ser Leu Ser Lys Gln
65 70

RIVENDICAZIONI

1. Sonda di acido nucleico (PNA) comprendente due sequenze differenti che sono:

(a) una sequenza a filamento singolo (1/2 TBR) che è in grado di formare, in condizioni di ibridazione, un ibrido (TBR) con un acido nucleico bersaglio (TNA); e

(b) una sequenza a filamento singolo (1/2 BBR) in grado di formare, in condizioni di ibridazione, un ibrido (BBR) con una sequenza a filamento singolo presente in un acido nucleico ausiliario (BNA); in cui detta TBR è in grado di legarsi con alta affinità ad una sostanza (TBA) capace di discriminare tra un ibrido accoppiato (TBR) e un ibrido avente nucleotidi non accoppiati, e in cui detta BBR è in grado di legarsi con elevata affinità ad una sostanza (BBA) capace di discriminare tra un ibrido accoppiato (BBR) ed un ibrido avente

nucleotidi non accoppiati.

2. PNA secondo la rivendicazione 1, in cui la TBR è costituita da uno o più siti di riconoscimento per una proteina di legame di acido nucleico, una proteina di legame del DNA, una proteina di legame dell'ibrido DNA-RNA o una proteina di legame di RNA.

3. PNA secondo la rivendicazione 2, in cui la TBR è un sito di riconoscimento della proteina di legame dell'acido nucleico presente nel genoma di un patogeno oppure è un sito legante associato con una condizione patogena in un genoma di vertebrato o in un sito di riconoscimento di proteina legante di acido nucleico presente nel genoma di un organismo che contamina un procedimento di fermentazione.

4. PNA secondo la rivendicazione 2, in cui la TBR è LTR di HIV o una sua porzione.

5. Procedimento per rivelare o localizzare una sequenza di TNA specifica, comprendente le fasi di:

(a) ibridare detto TNA con il PNA della rivendicazione 1;

(b) ibridare detto PNA con un BNA contenente una 1/2 BBR la cui sequenza è complementare alla sequenza di 1/2 BBR del PNA;

(c) aggiungere i prodotti delle fasi (a) e (b) contenente una TBR e una BBR ad una superficie, li-

quido o altro mezzo contenente un TBA;

(d) aggiungere i BBA alla miscela della fase (c) in cui detto BBA comprende:

(i) una molecola o una porzione di molecola in grado di legarsi selettivamente ad una BBR;

(ii) un indicatore rilevabile, e

(e) rilevare il segnale prodotto dall'indicatore attaccato al BBA.

6. Procedimento secondo la rivendicazione 5, in cui detto indicatore è una proteina, comprendente enzimi in grado di catalizzare reazioni che portano alla produzione di prodotti di reazione colorati; un radionuclide; perline colorate.

7. Procedimento *in vitro* di amplificazione del segnale ottenuto attraverso il legame di PNA secondo la rivendicazione 1 ad un TNA, che comprende il legame di BNA all'ibrido PNA-TNA, ed il legame di BBA marcati ai BNA.

8. Procedimento per la rivelazione o la localizzazione di sequenze di acido nucleico specifiche con un alto grado di sensibilità e specificità, che comprende:

(a) aggiungere i PNA come definiti nella rivendicazione 1, contenente una 1/2 BBR e una 1/2 TBR, ad un campione contenente o sospettato di contenere TNA

avente sequenze di 1/2 TBR, per formare un complesso avente regioni leganti bersaglio, TBR, formate mediante ibridazione di 1/2 TBR complementari presenti nei PNA e, rispettivamente, TNA;

(b) legare i TBR formati nella fase (a) ad un TBA immobilizzato per formare un complesso TBA-TNA-PNA;

(c) aggiungere acidi nucleici ausiliari, BNA contenenti regioni leganti ausiliarie, 1/2 BBR, al complesso formato nella fase (b) in modo che 1/2 BBR nei BNA si ibridi con le sequenze 1/2 BBR presenti nei PNA o a 1/2 BBR presenti in BNA già legati a PNA per formare BBR, cosicché si formano i complessi TBA-TNA-PNA-(BNA)_n;

(d) aggiungere acidi nucleici a forcina, HNA, contenenti sequenze 1/2 BBR, al complesso formato nella fase (c) in modo che 1/2 BBR in HNA si ibridi con qualsiasi sequenza 1/2 BBR disponibile presente nei BNA del complesso della fase (c), chiudendo in tal modo il prolungamento dei BNA sui complessi TBA-TNA-PNA-(BNA)_n della fase (c) per formare complessi TBA-TNA-PNA-(BNA)_n-HNA;

(e) aggiungere gruppi leganti booster, BBA, legati a parti di indicatore, ai complessi TBA-TNA-PNA-(BNA)_n-HNA formati nella fase (d) per formare com-

plexi TBA-TNA-PNA-(BNA-BBA)_n-HNA; e

(f) rivelare i segnali prodotti dalla parte di indicatore legata ai TBA, PNA, BNA, BBA o HNA nei complessi TBA-TNA-PNA-(BNA-BBA)_n-HNA della fase (e); in cui il TNA comprende:

(i) una o più sequenze specifiche di acido nucleico 1/2 TBR, la presenza o l'assenza delle quali in un particolare campione deve essere confermata;

il BNA comprende:

(i) una 1/2 BBR, come mostrato nella Figura 1 (IIb) che ha una sequenza complementare alla sequenza di 1/2 BBR in un PNA e che è in grado di formare, in condizioni di ibridazione un ibrido, BBR, con il PNA;

(ii) una OSA, che non è un supporto attaccato o indicatore o un supporto attaccato o altro mezzo di localizzazione, compresi, ma senza limitarsi a questi, attacchi a perline, polimeri e superfici e/oppure indicatori;

(iii) altri siti di ibridazione 1/2 BBR, per altri BNA; e

(iv) sequenze, 1/2 BBR, che si possono ibridare a BNA già ibridato a PNA;

il BBA comprende:

(i) una molecola o una parte di una molecola in grado legarsi selettivamente a BBR; e

(ii) una OSA, che non è un supporto attaccato e/oppure indicatore, o un supporto attaccato o altro mezzo di localizzazione, comprendente, ma non limitatamente a questi, attacco a perline, polimeri e superfici e/oppure indicatori;

e il TBA comprende:

(i) una molecola o una porzione di una molecola in grado di legarsi selettivamente a una TBR; e

(ii) nessun supporto attaccato e/oppure indicatore oppure un supporto attaccato o altro mezzo di localizzazione comprendente, ma non limitatamente a questi, attacchi a perline, polimeri e superfici e/oppure indicatori.

9. Metodo di ibridazione in fase solida per rivelare la presenza di un polinucleotide bersaglio usando un PNA come definito nella rivendicazione 1, che comporta: immobilizzazione di un polinucleotide bersaglio, se presente nel campione di prova, direttamente o attraverso una struttura di cattura intermedia, su una fase solida in un sito di cattura; prima, durante o dopo detta immobilizzazione, attacco di un marcatore rivelabile a detto polinucleotide bersaglio, se presente; e rivelazione di detto marcatore, se presente, in detto sito di cattura; in cui l'immobilizzazione comprende l'uso di un gruppo legante bersaglio (TBA) che si lega soltanto ad un ibrido u-

nico dell'acido nucleico bersaglio e ad un acido nucleico di sonda (PNA) comprendente una 1/2 BBR in grado di legarsi ad un acido nucleico booster (BNA) contenente un filamento singolo complementare di 1/2 BBR che, per ibridazione con 1/2 BBR nel PNA, forma una BBR in grado di legare gruppi leganti booster marcati (BBA) in cui i termini TBA, BNA, BBR e BNA hanno il significato indicato nella rivendicazione 1.

10. Kit per test diagnostico o forense per la rivelazione di una sequenza di acido nucleico bersaglio in un campione di acido nucleico, che comprende una prima ed una seconda sonda di acido nucleico ed una prima ed una seconda proteina legante di acido nucleico,

in cui la prima sonda ha una sequenza complementare alla sequenza bersaglio e una sequenza addizionale;

la prima proteina legante è specifica per il primo duplex sonda-bersaglio;

la seconda sonda è complementare con la sequenza addizionale sulla prima sonda; e

la seconda proteina legante si lega specificamente al duplex prima sonda-seconda sonda, ed è marcata con un marcatore rivelabile.

11. Kit secondo la rivendicazione 10, in cui la prima sonda è complementare a LTR di HIV e, per ibridazione della prima sonda con LTR di HIV, si forma un

sito legante per NF-kB o una sua subunità, SP1, proteina legante TATA, HIV-Detect I, II, III o IV, oppure HIV-Lock.

12. Kit secondo la rivendicazione 11, in cui la prima proteina legante è NF-kB o una sua subunità, SP1, proteina legante TATA, HIV-Detect I, II, III o IV o HIV-Lock.

13. Kit secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 10 a 12, in cui la prima sonda, oltre ad essere complementare a LTR di HIV, comprende una sequenza che codifica l'operatore sinistro o destro del batteriofago lambda e la seconda sonda comprende una sequenza complementare a detta sequenza di operatore sinistro o destro del batteriofago lambda cosicché, per ibridazione della prima e seconda sonda, viene formato un sito di legame per la proteina repressore CI del batteriofago lambda, la proteina *cro* del batteriofago lambda o un loro derivato o omologo.

14. Kit secondo la rivendicazione 13, in cui la seconda proteina legante è la proteina repressore CI del batteriofago lambda, la proteina *cro* del batteriofago lambda o un suo derivato o omologo.

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO

Si dichiara che la traduzione è perfettamente conforme al testo originale del brevetto accettato dall'Ufficio Brevetti Europeo.

Mirko BERGADANO

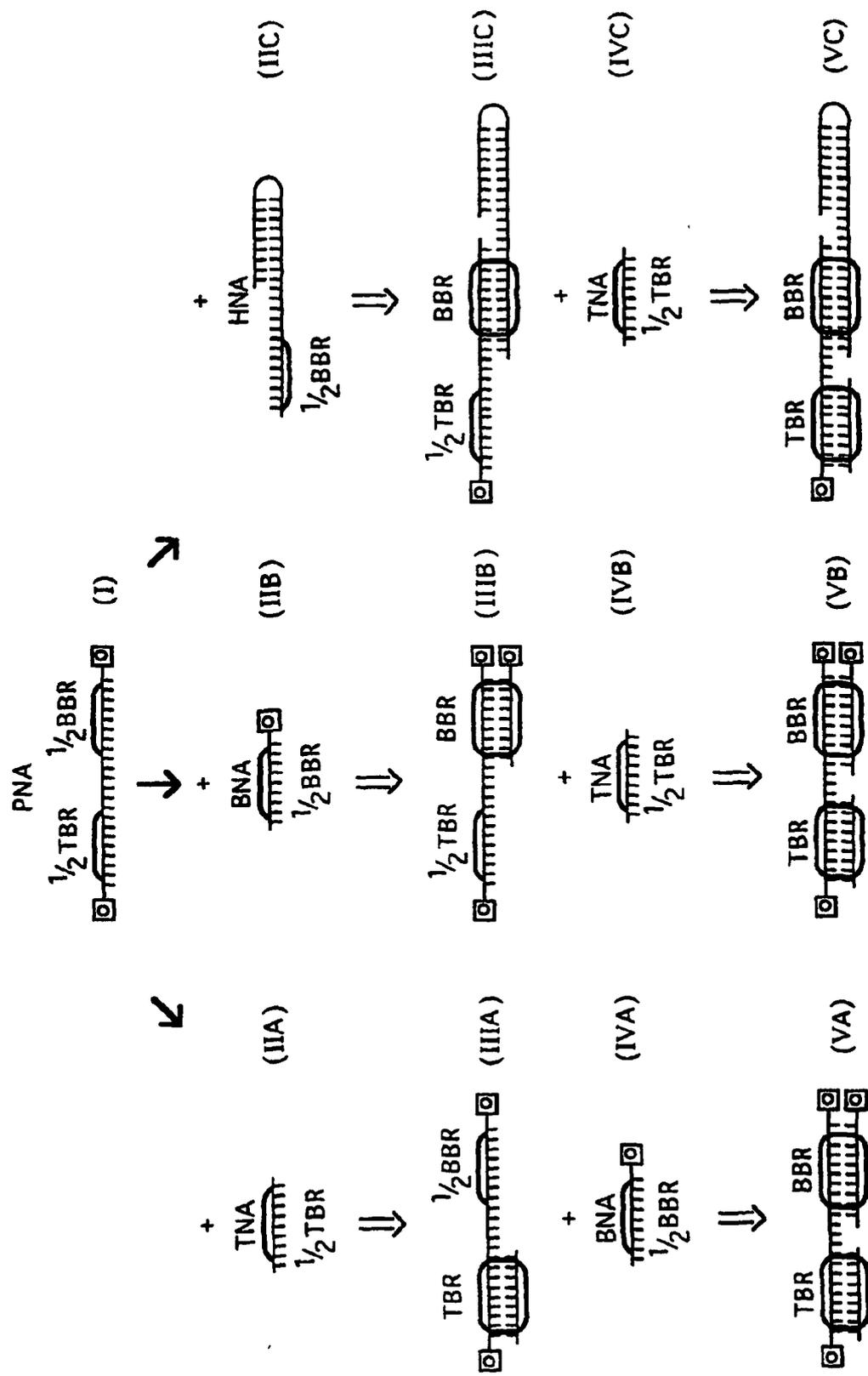


FIGURA 1

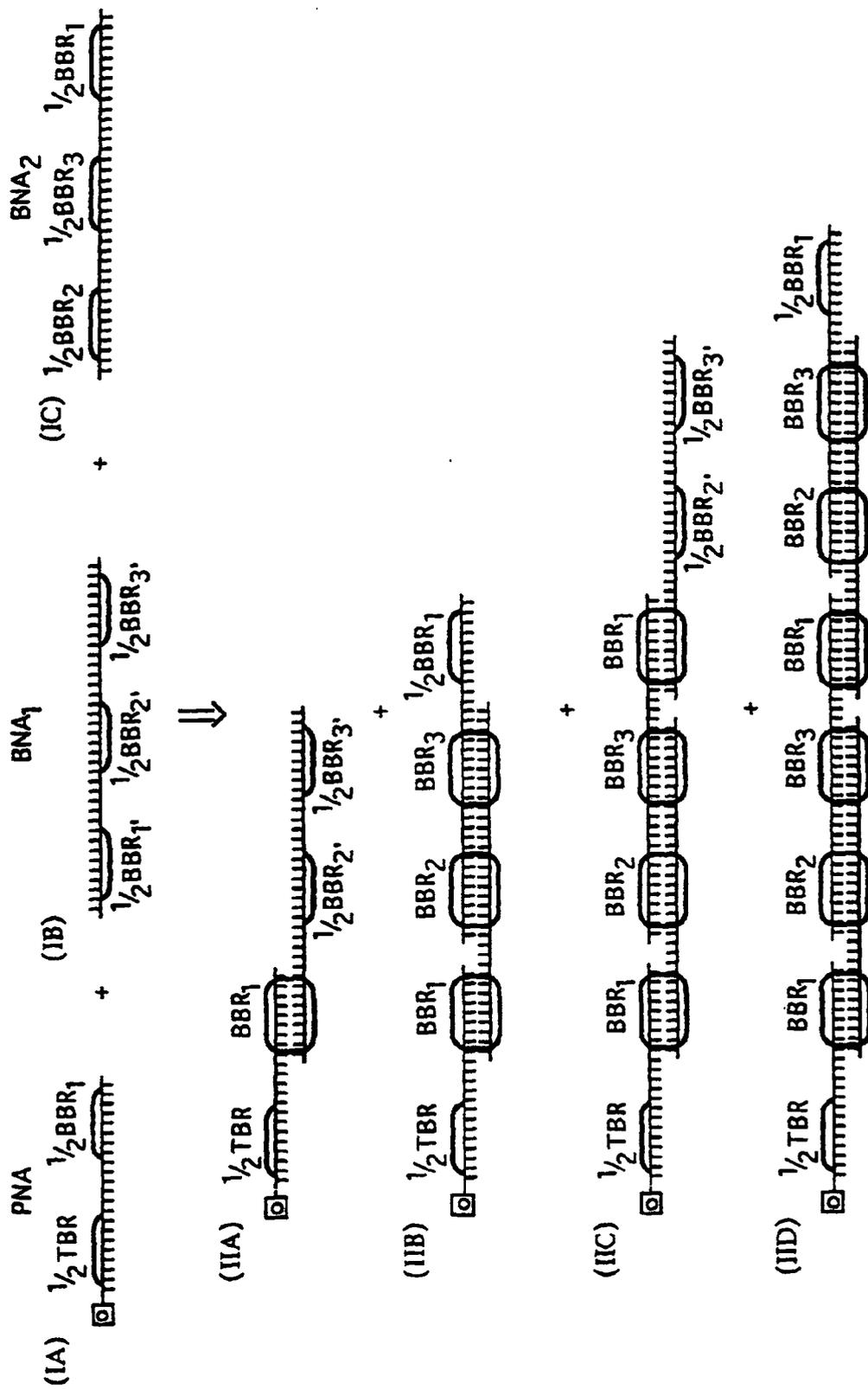


FIGURA 2A

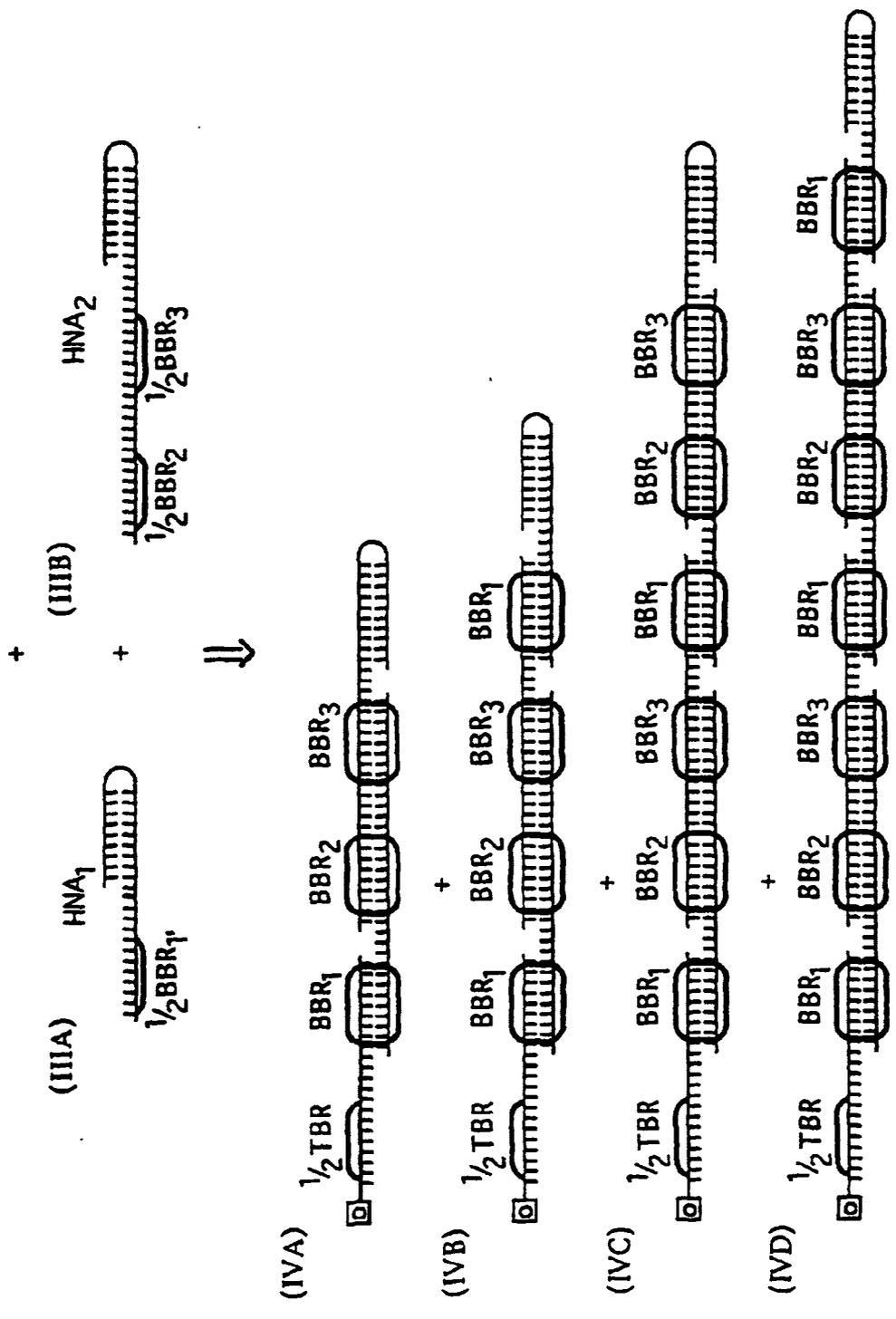


FIGURA 2B

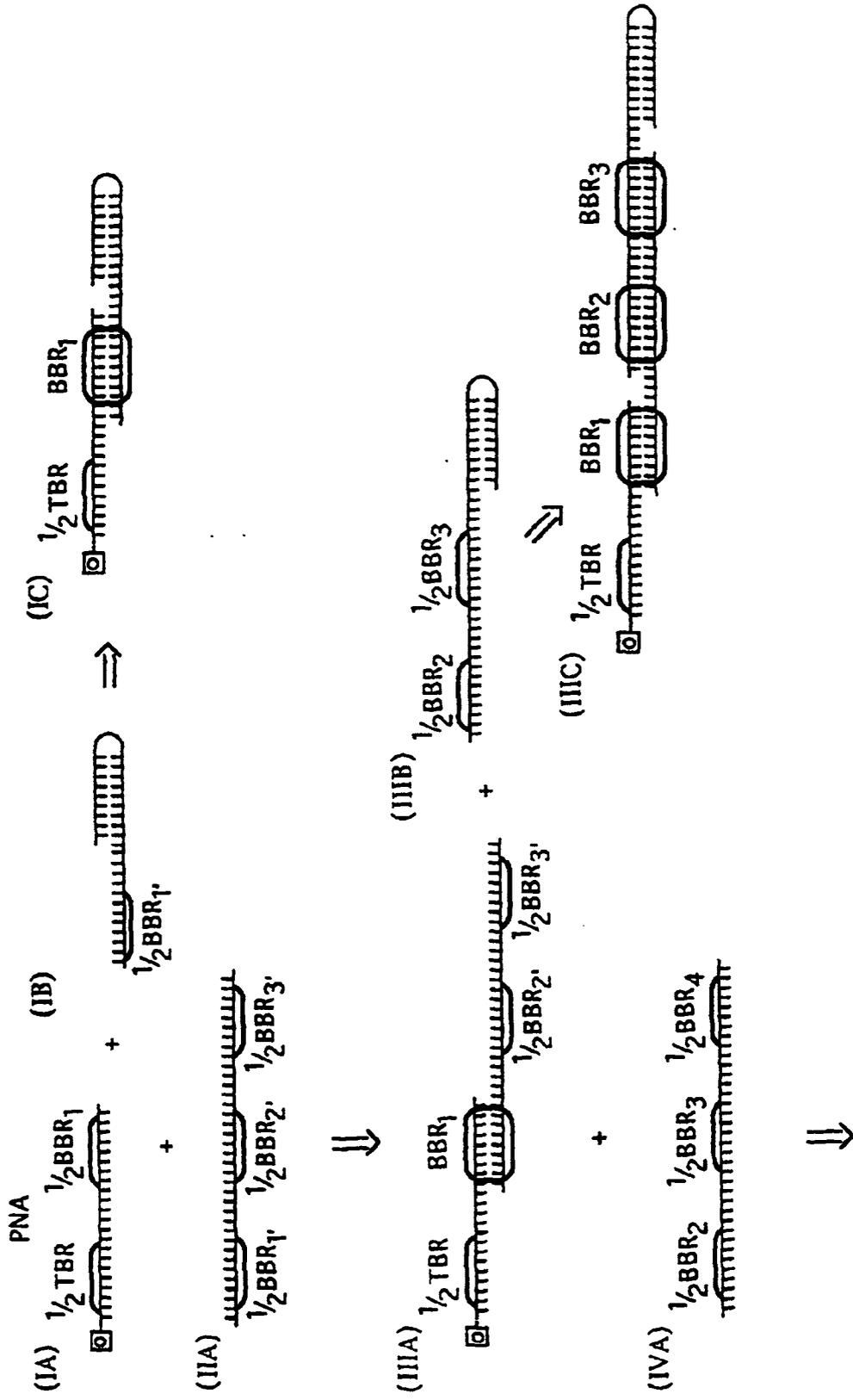


FIGURA 2C

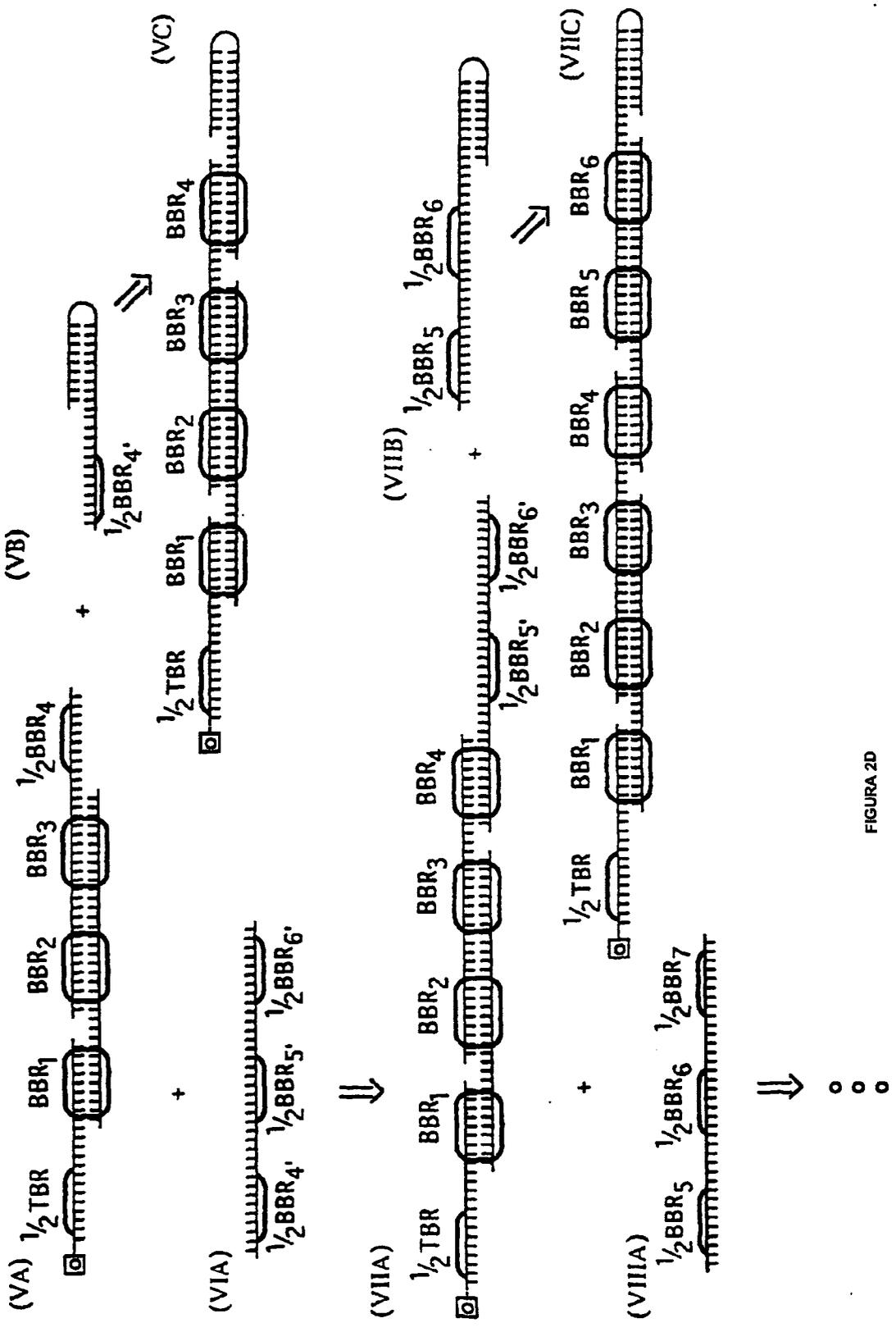


FIGURA 2D

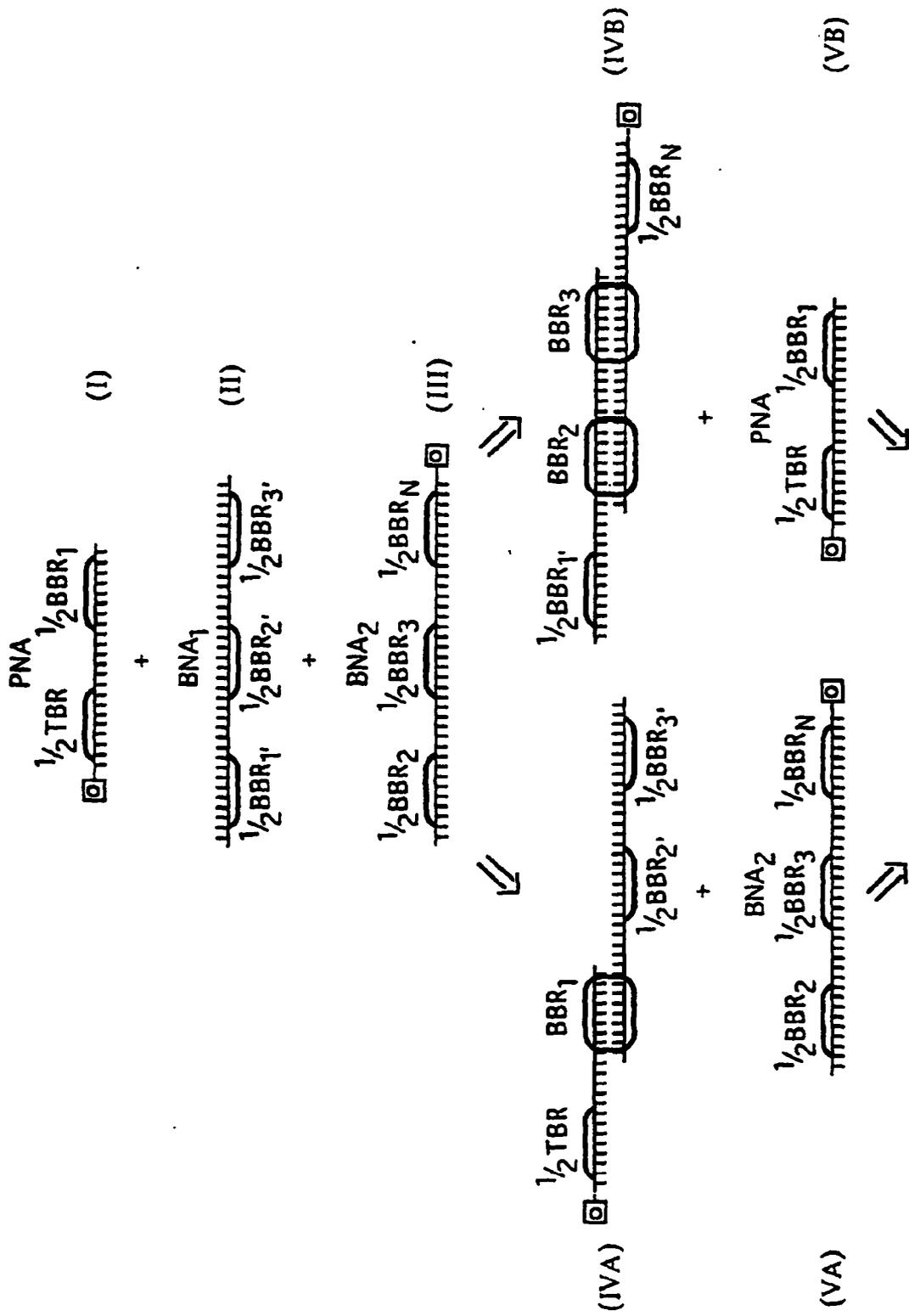


FIGURA 3A

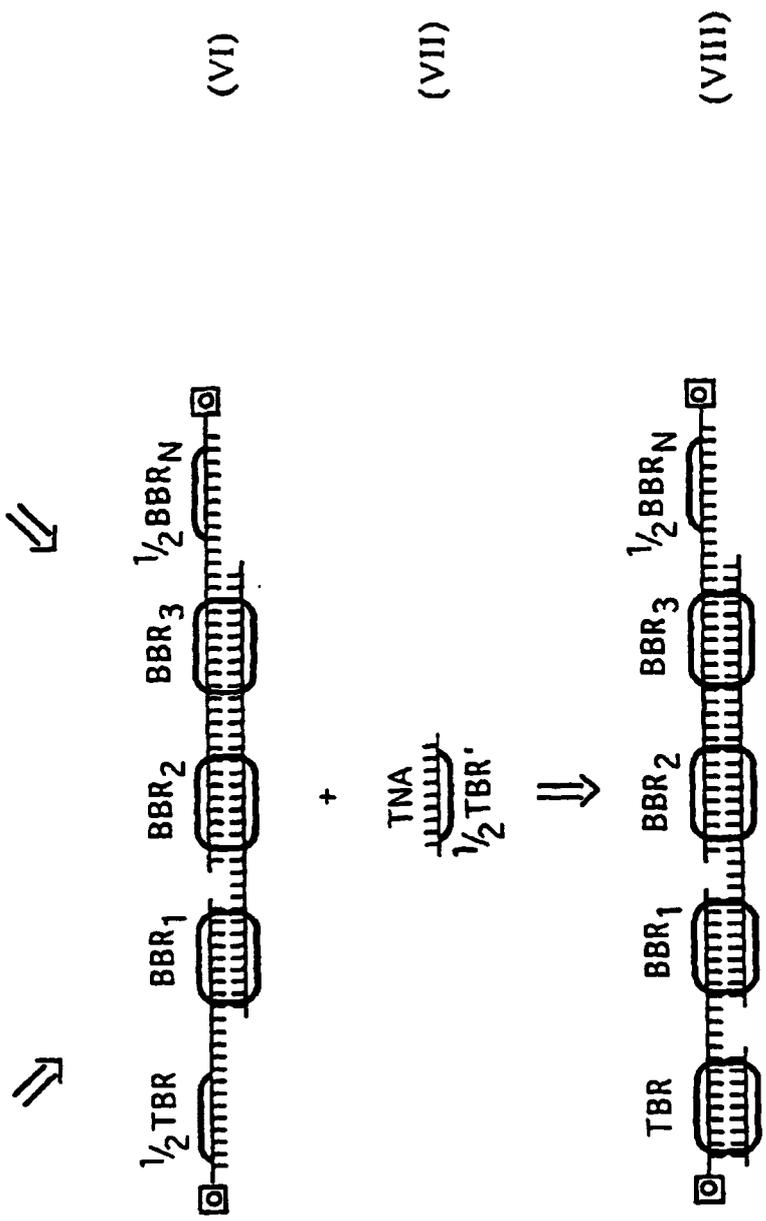


FIGURA 3B

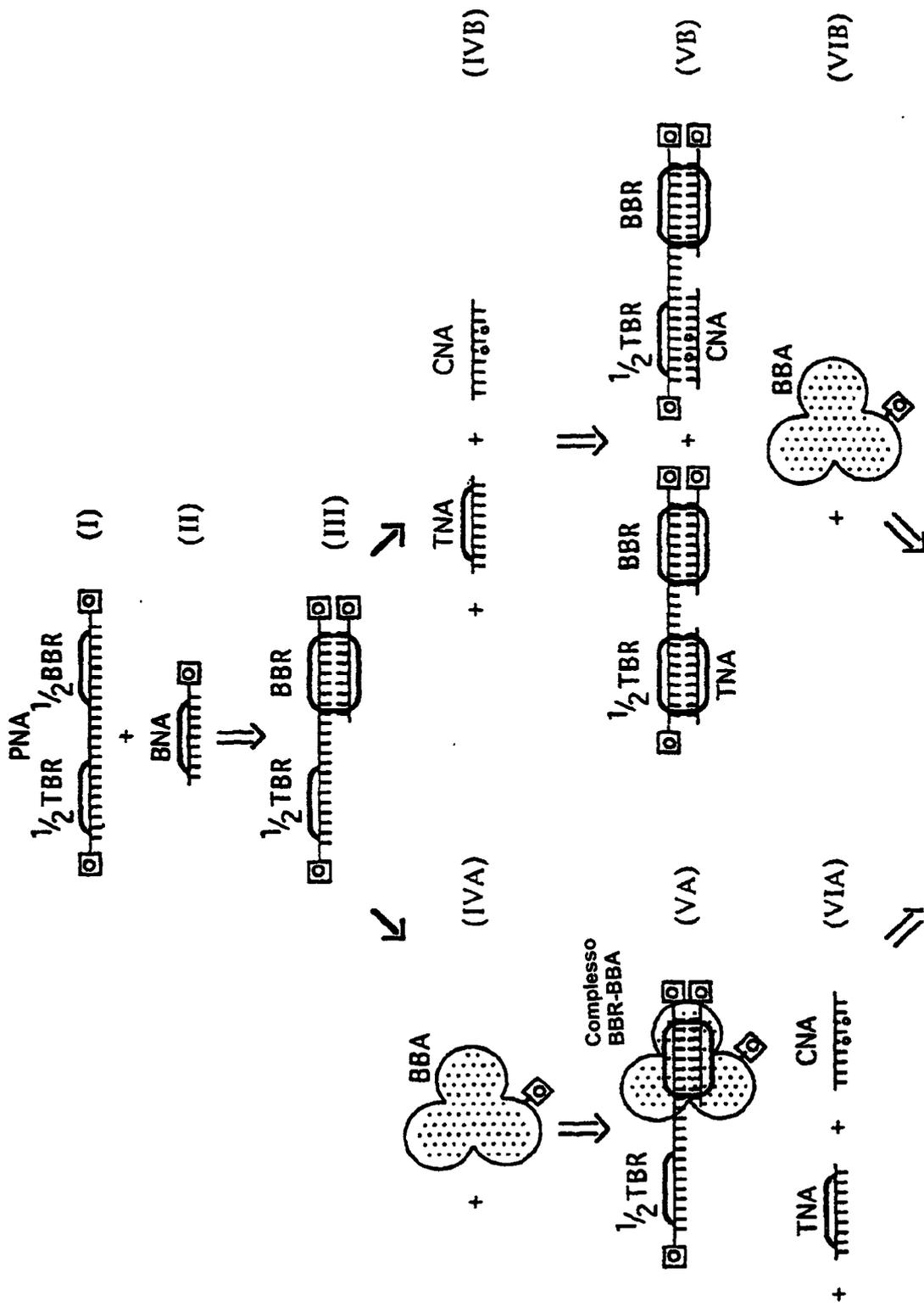


FIGURA 4A

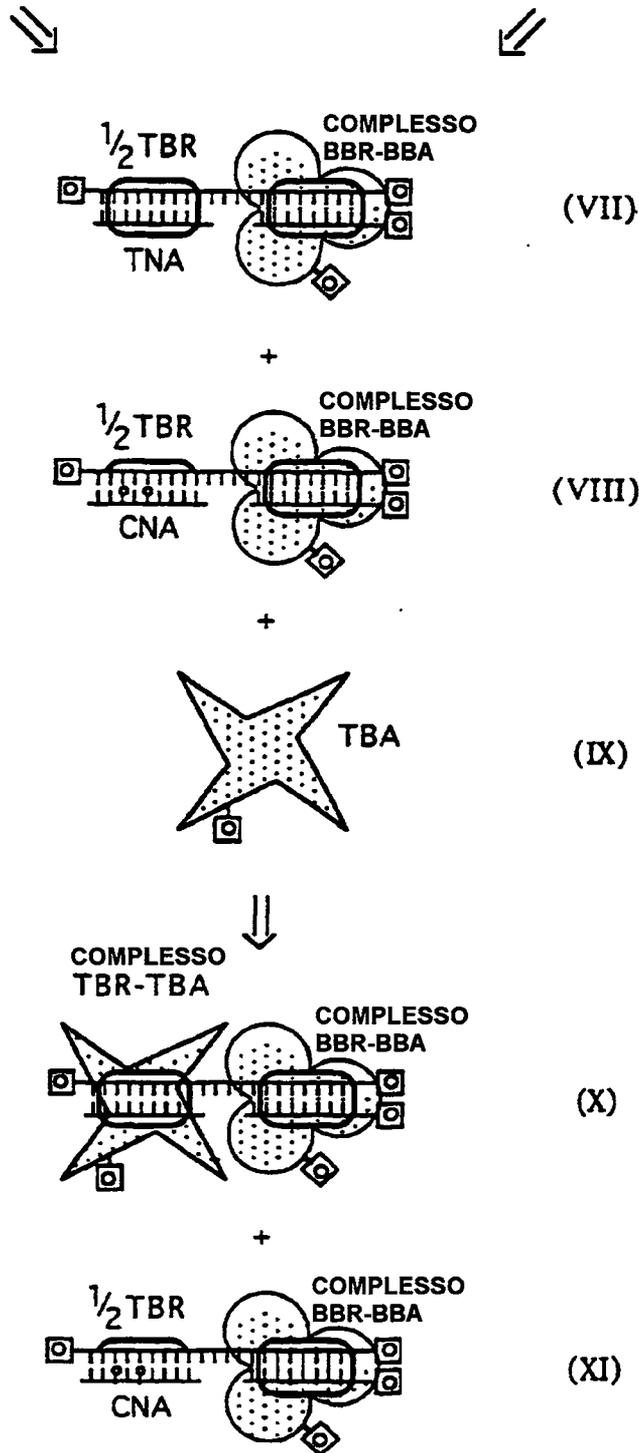


FIGURA 4B

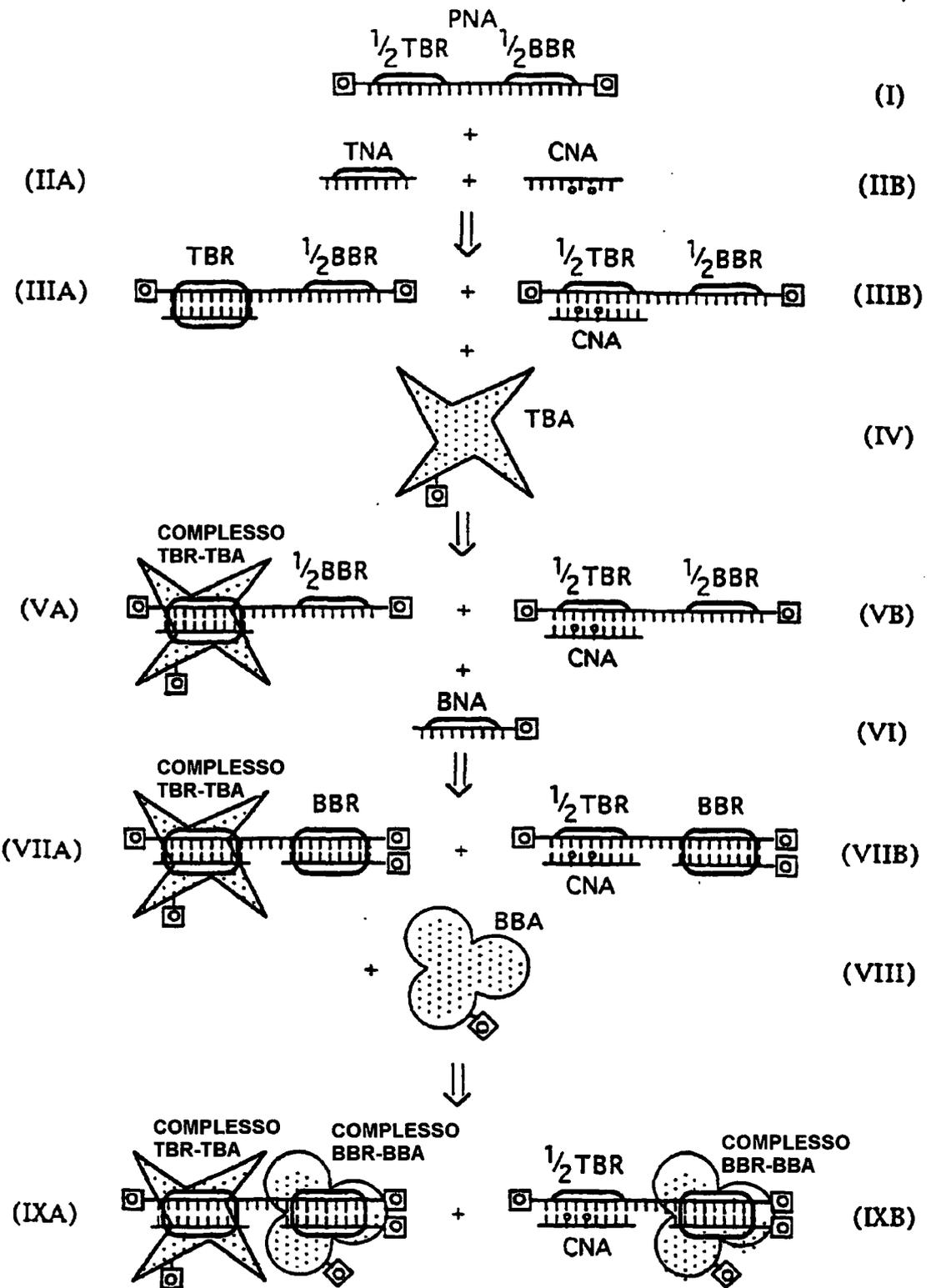


FIGURA 4C

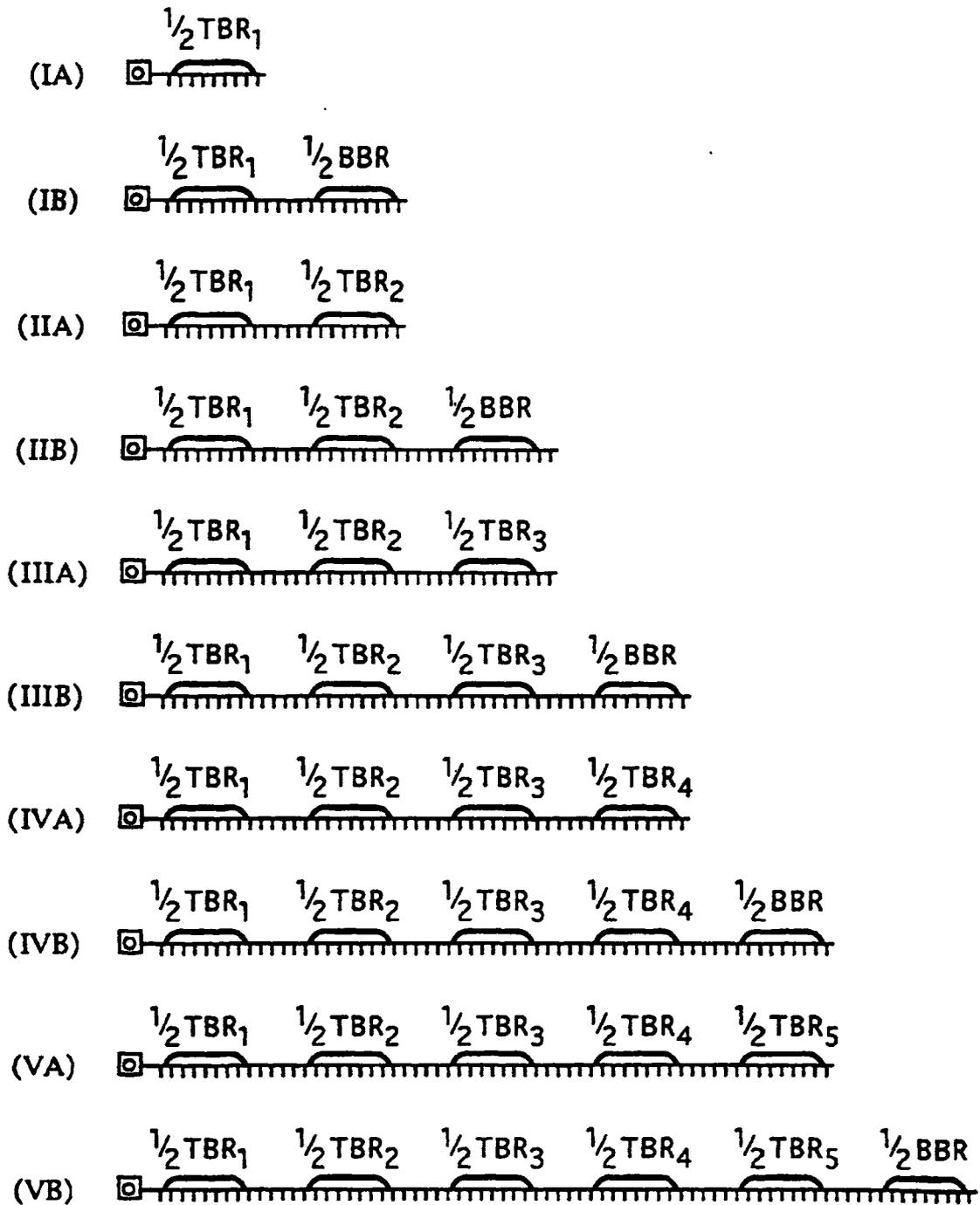


FIGURA 5

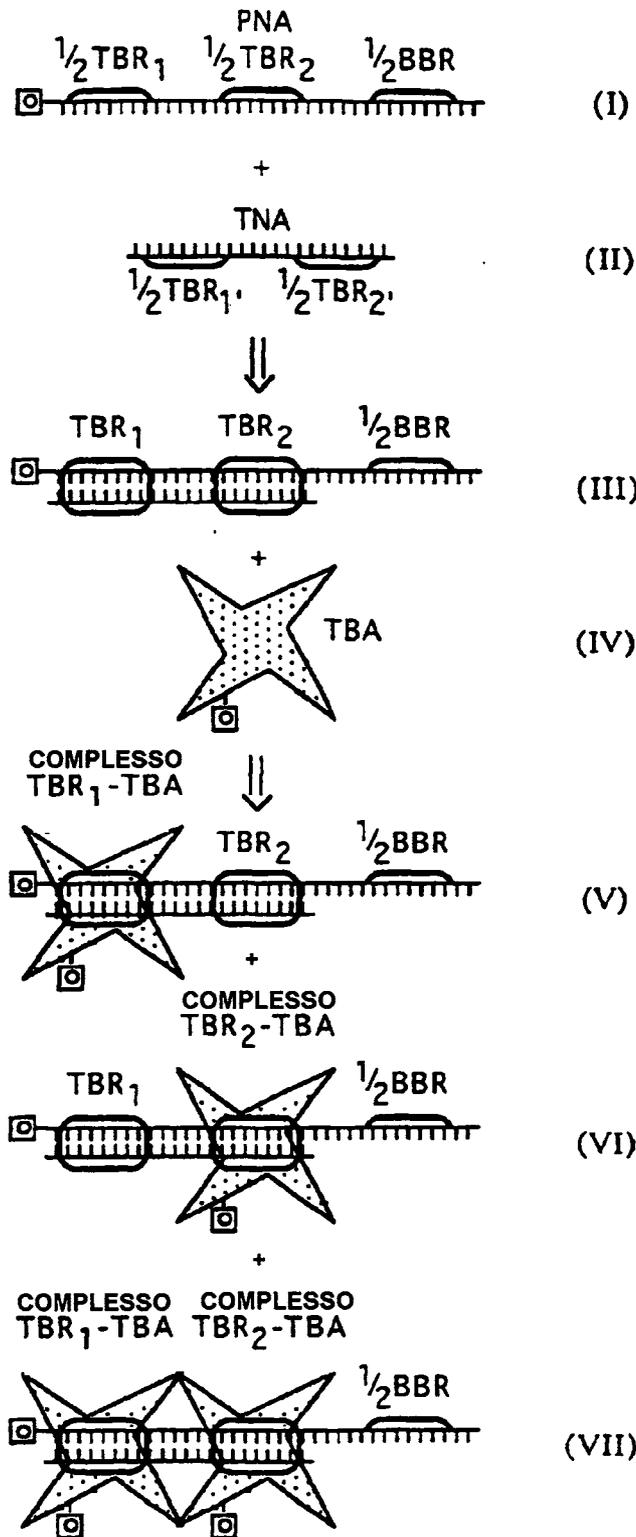


FIGURA 6A

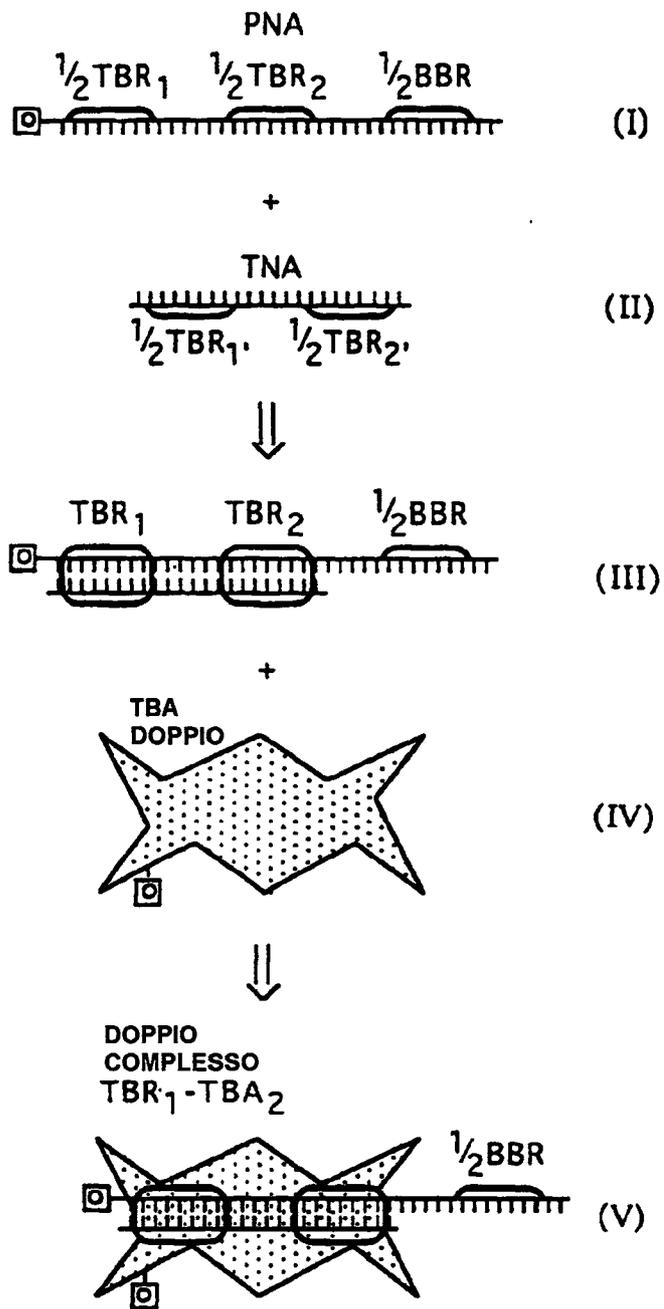


FIGURA 6B

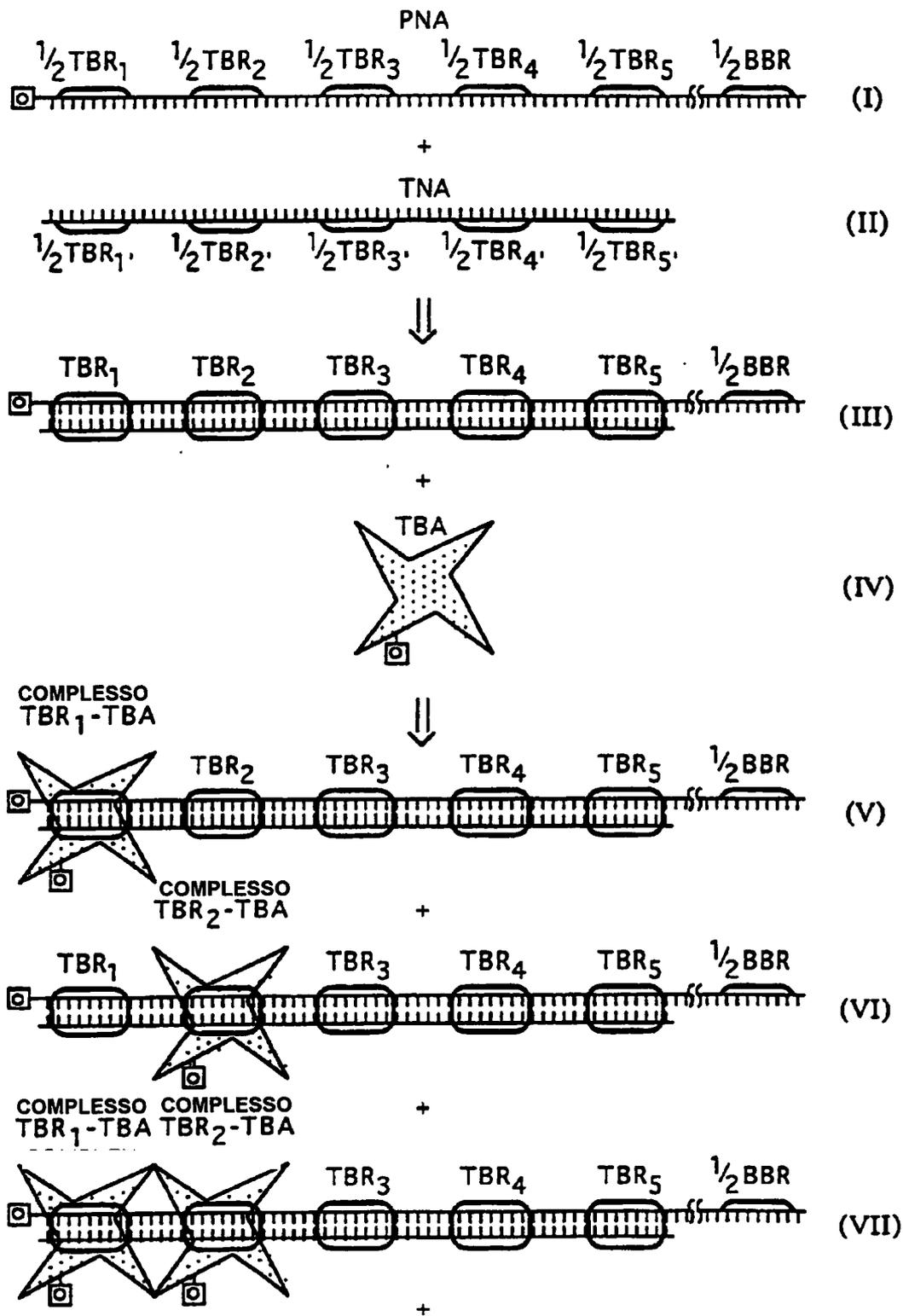


FIGURA 6C

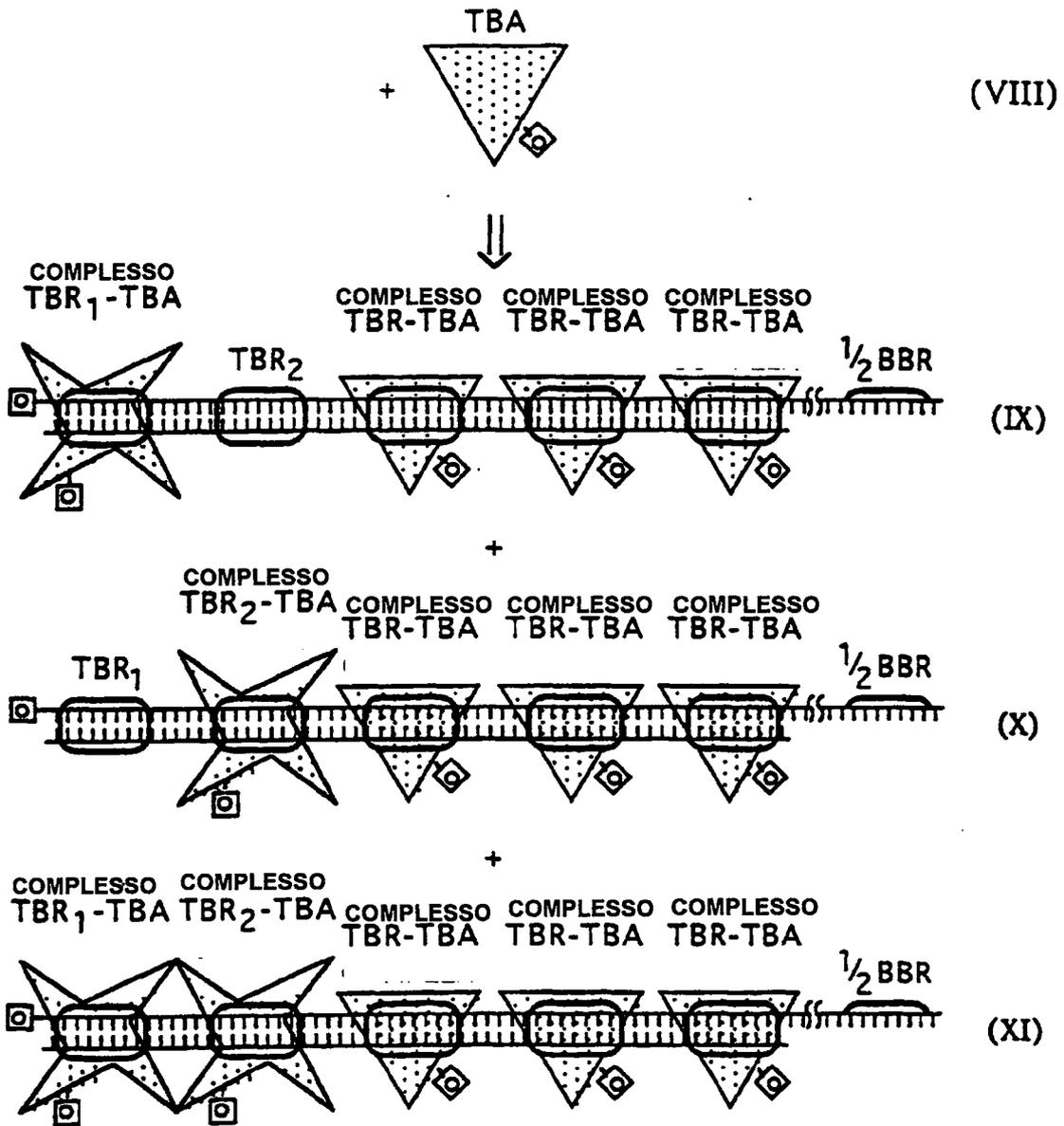


FIGURA 6D

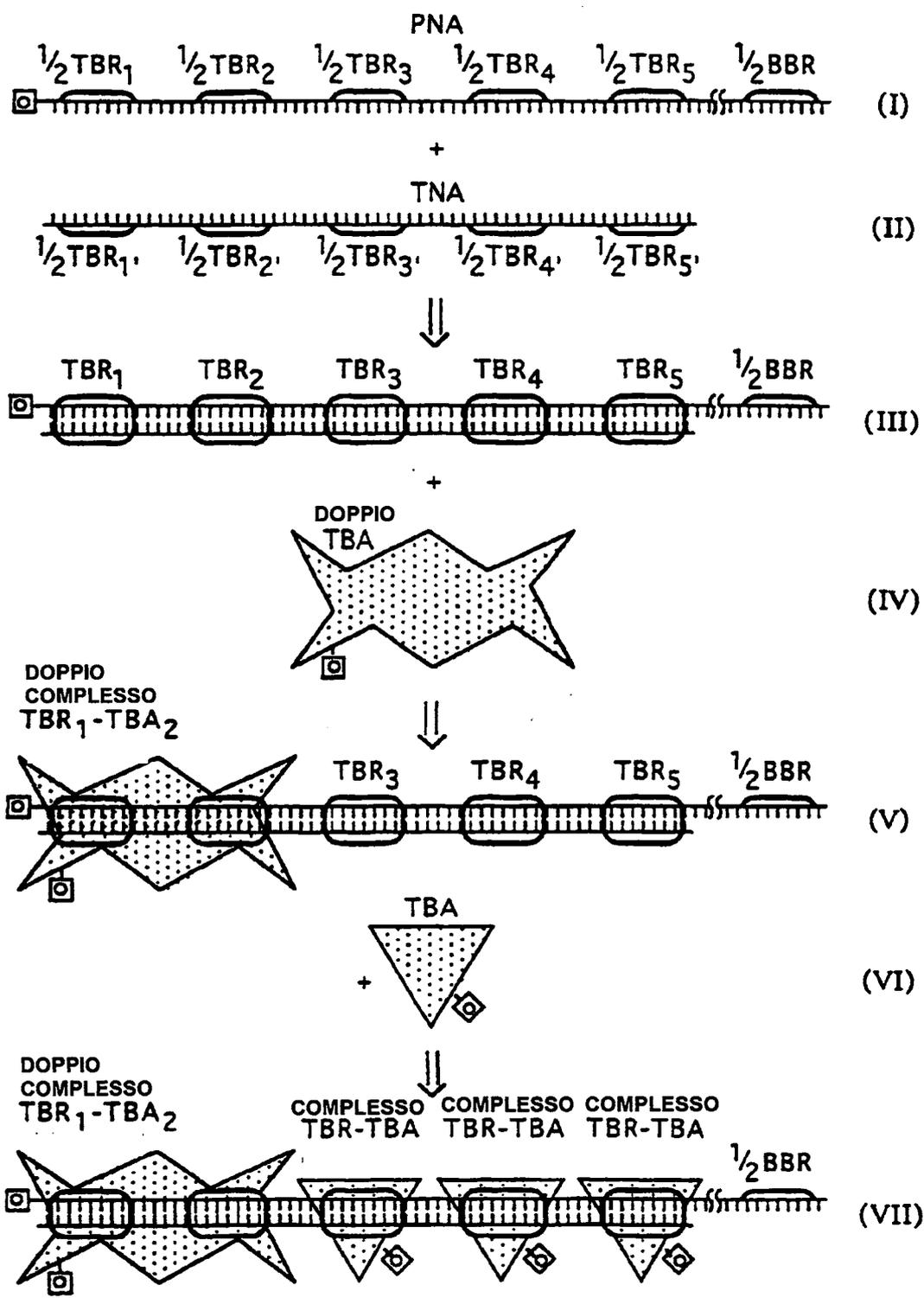


FIGURA 6E

SEQ. ID: 37:

12345678901234567890123456789012345678901234567890
CTACAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGGAGGGCTGGCCTGGGCGGGACTGGGGAGTGGCGTCCC
+++++
NF-kB NF-kB SP1 SP1 SP1

Kit di prova HIV PNA1 (+++ da prima), sequenza identificazione: 38:

CTACAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGGAGG

Kit di prova HIV PNA2 (=== da prima), sequenza identificazione: 39:

###CGGGACTGGGGAGTGGCGTCCC###

La sequenza terminale adesiva di PNA2 è complementare a una delle estremità del DNA operatore formata tra:

###OL1-OL2-OL3
OL1'-OL2'-OL3'***

or

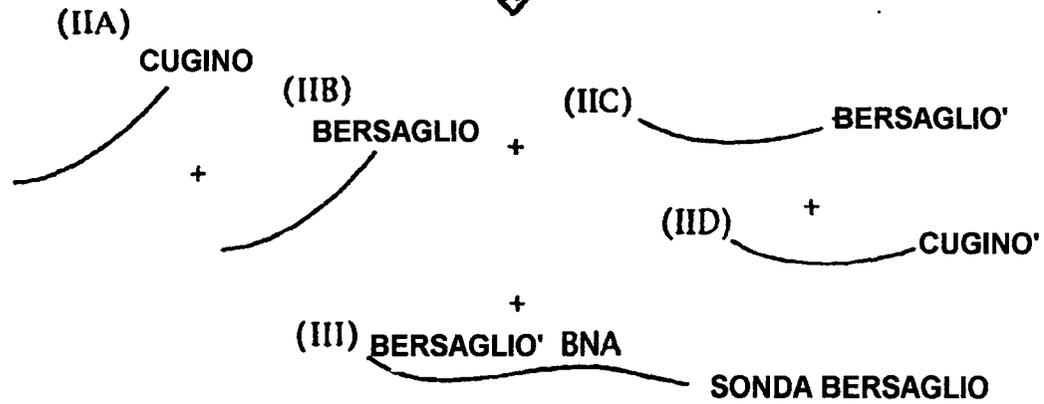
###OR3-OR2-OR1
OR3'-OR2'-OR1'***

FIGURA 7

CAMPIONE DI ACIDO NUCLEICO A DOPPIO
FILAMENTO FRAMMENTATO



⇓ DENATURARE A FILAMENTI SINGOLI



⇓

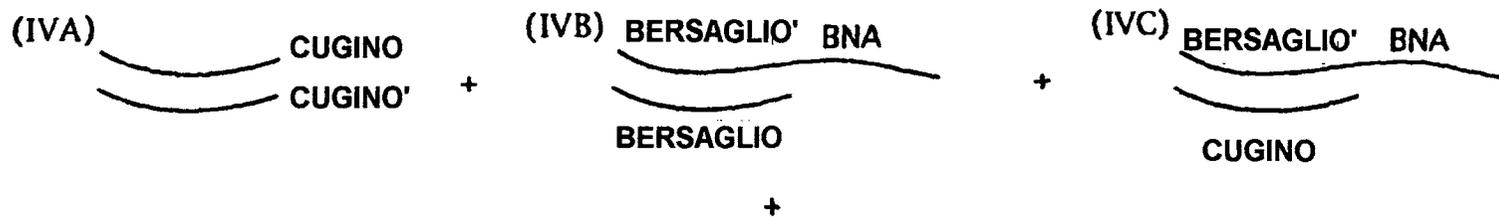


FIGURA 8A

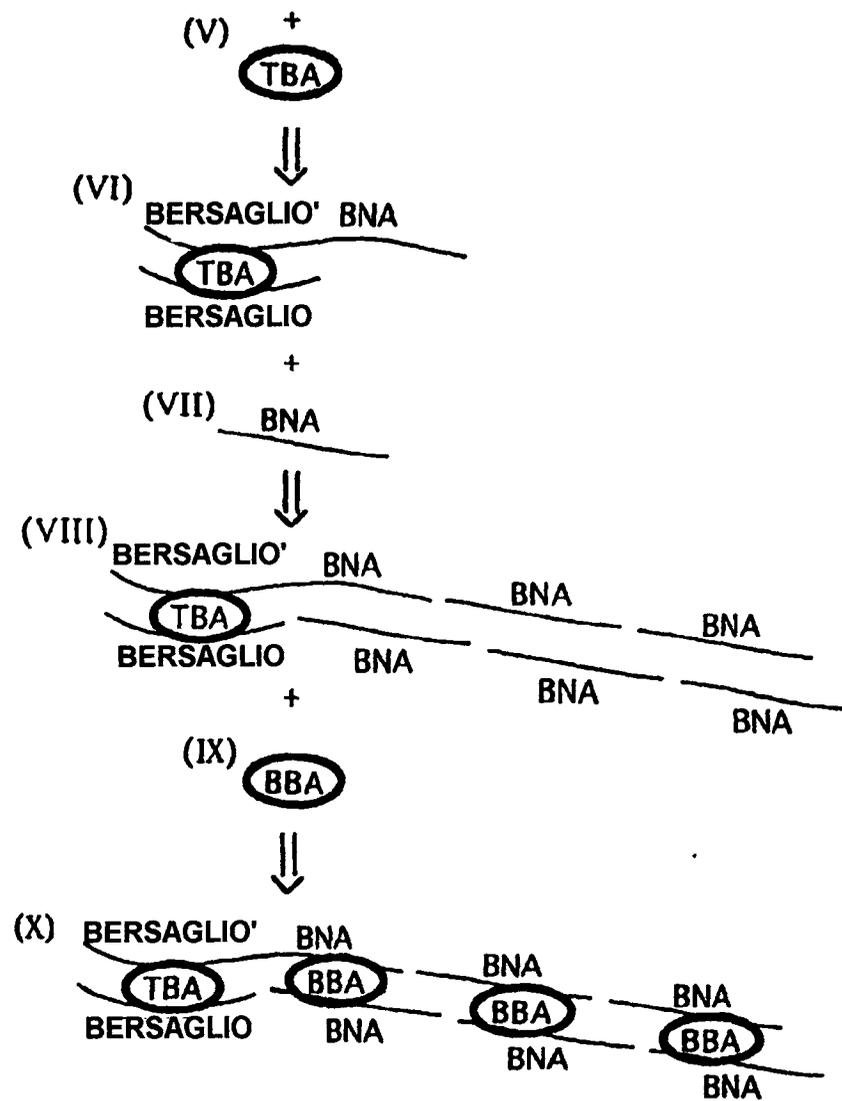


FIGURA 8B

TBA: GRUPPO DI LEGAME DEL BERSAGLIO

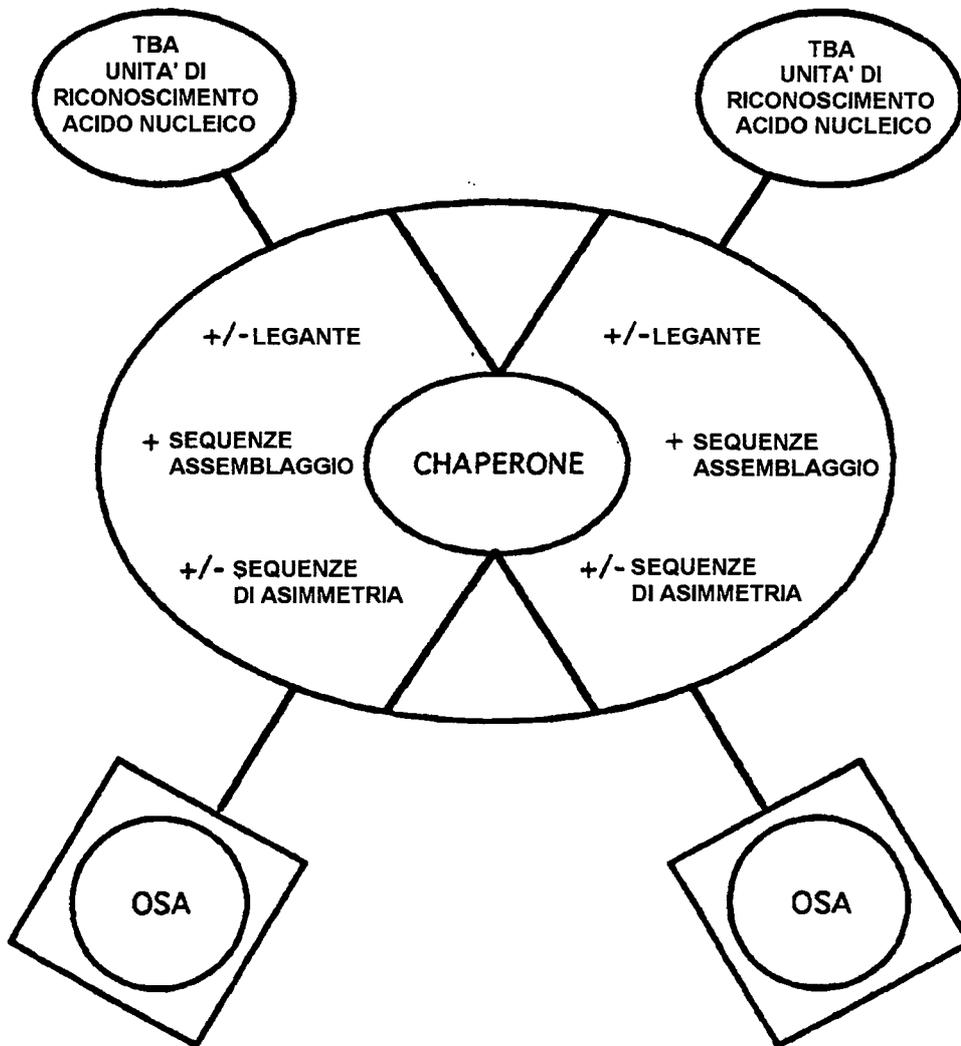
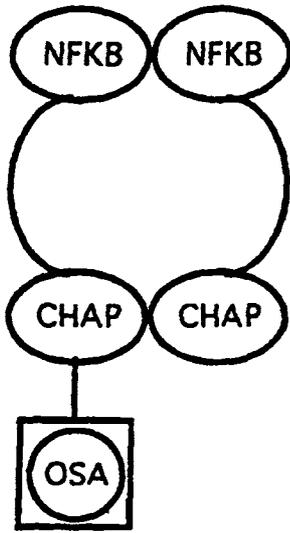
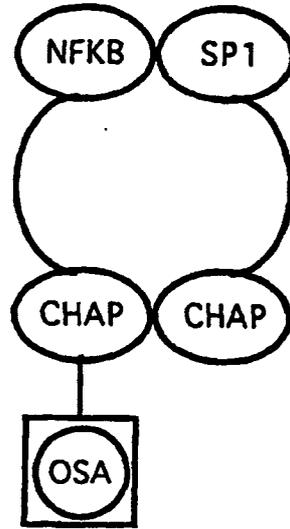


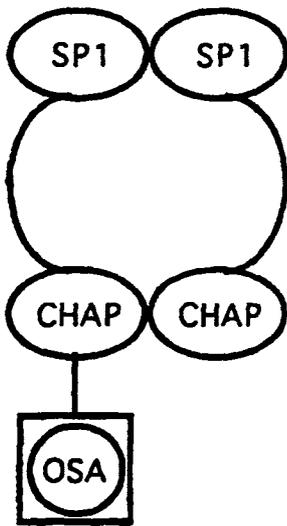
FIGURA 9



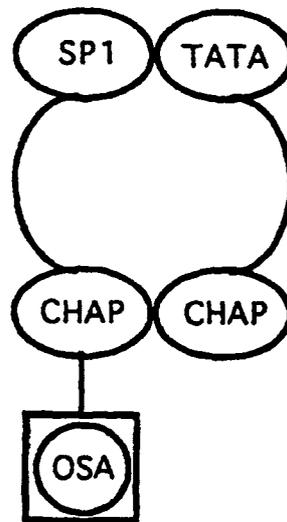
HIV-DETECT I



HIV-DETECT II

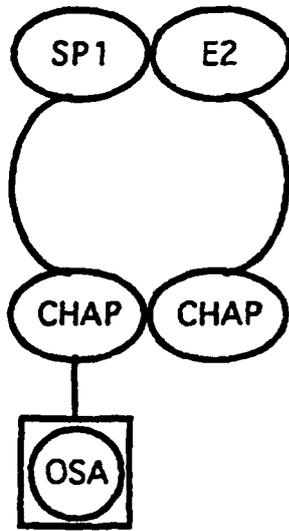


HIV-DETECT III

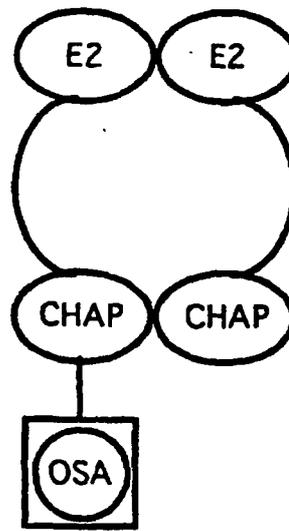


HIV-DETECT IV

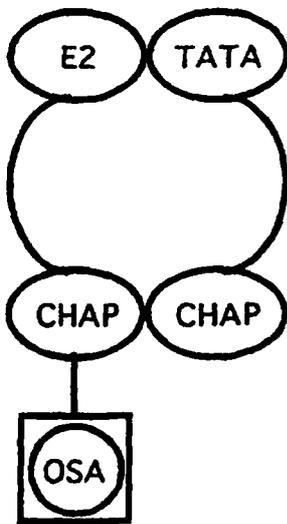
FIGURA 10



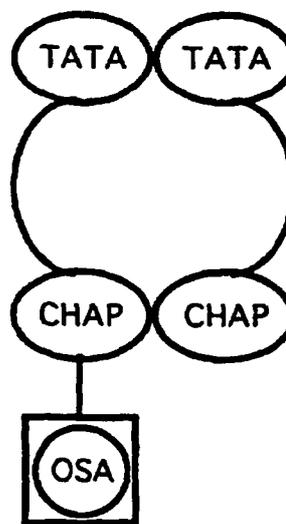
HPV-DETECT I



HPV-DETECT II



HPV-DETECT III



HPV-DETECT IV

FIGURA 11

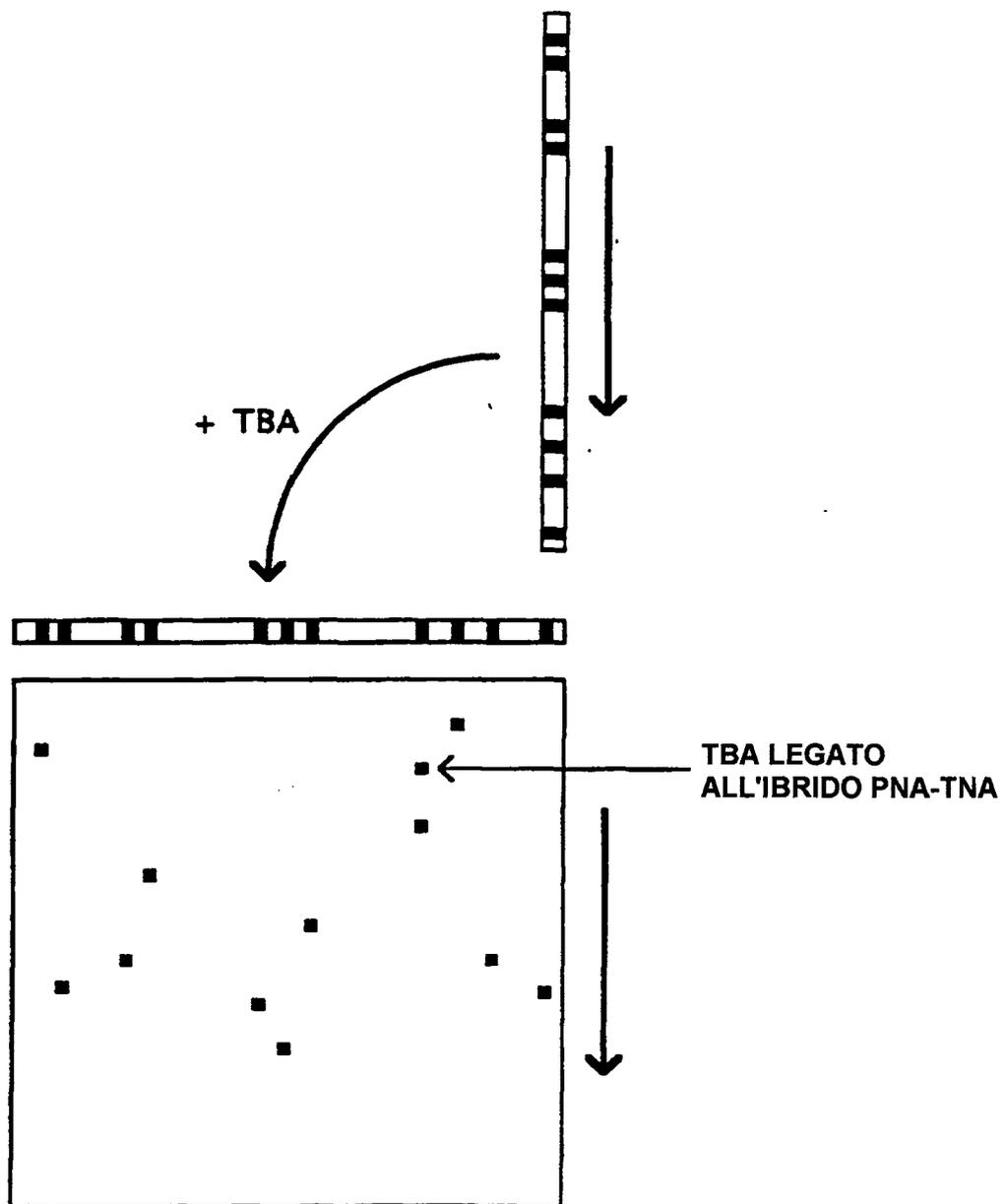


FIGURA 12A

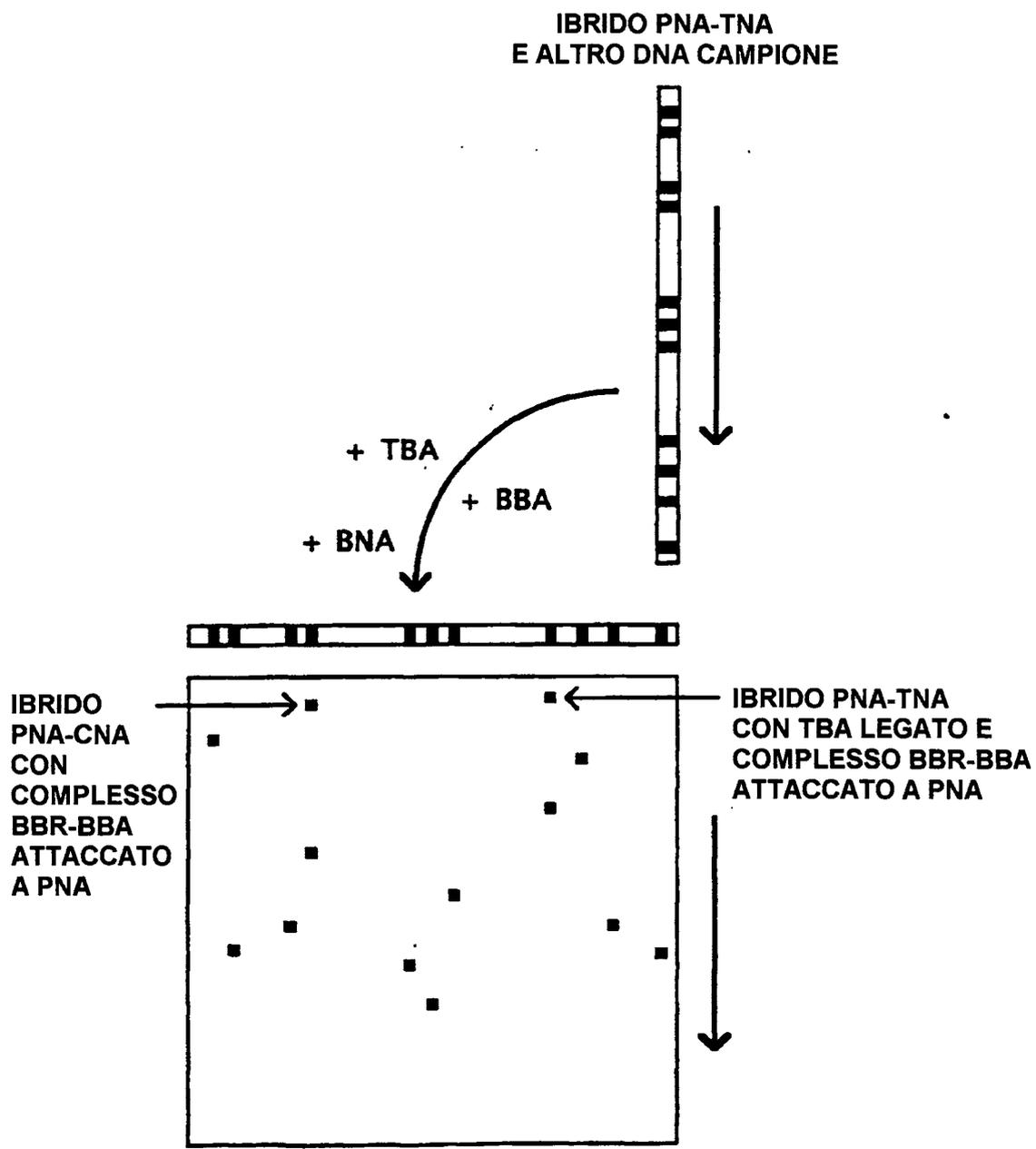


FIGURA 12B

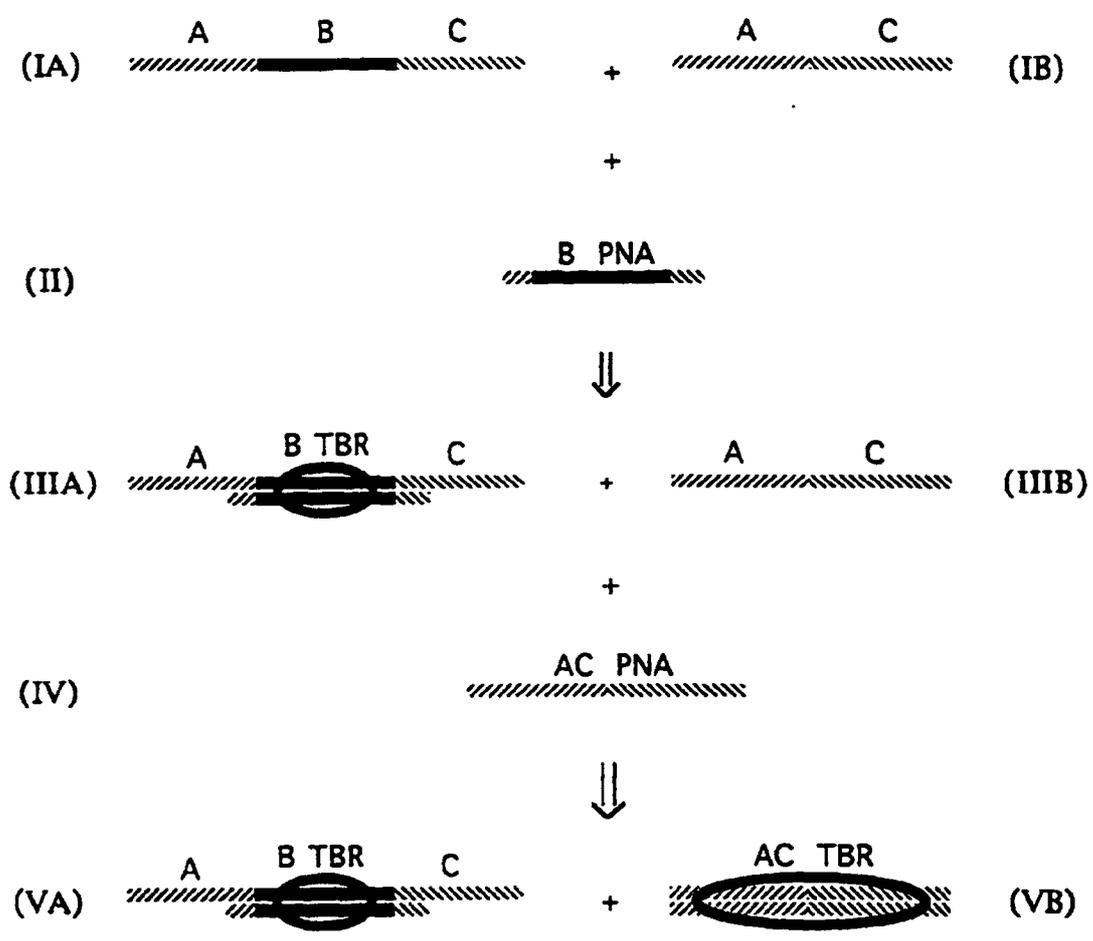


FIGURA 13

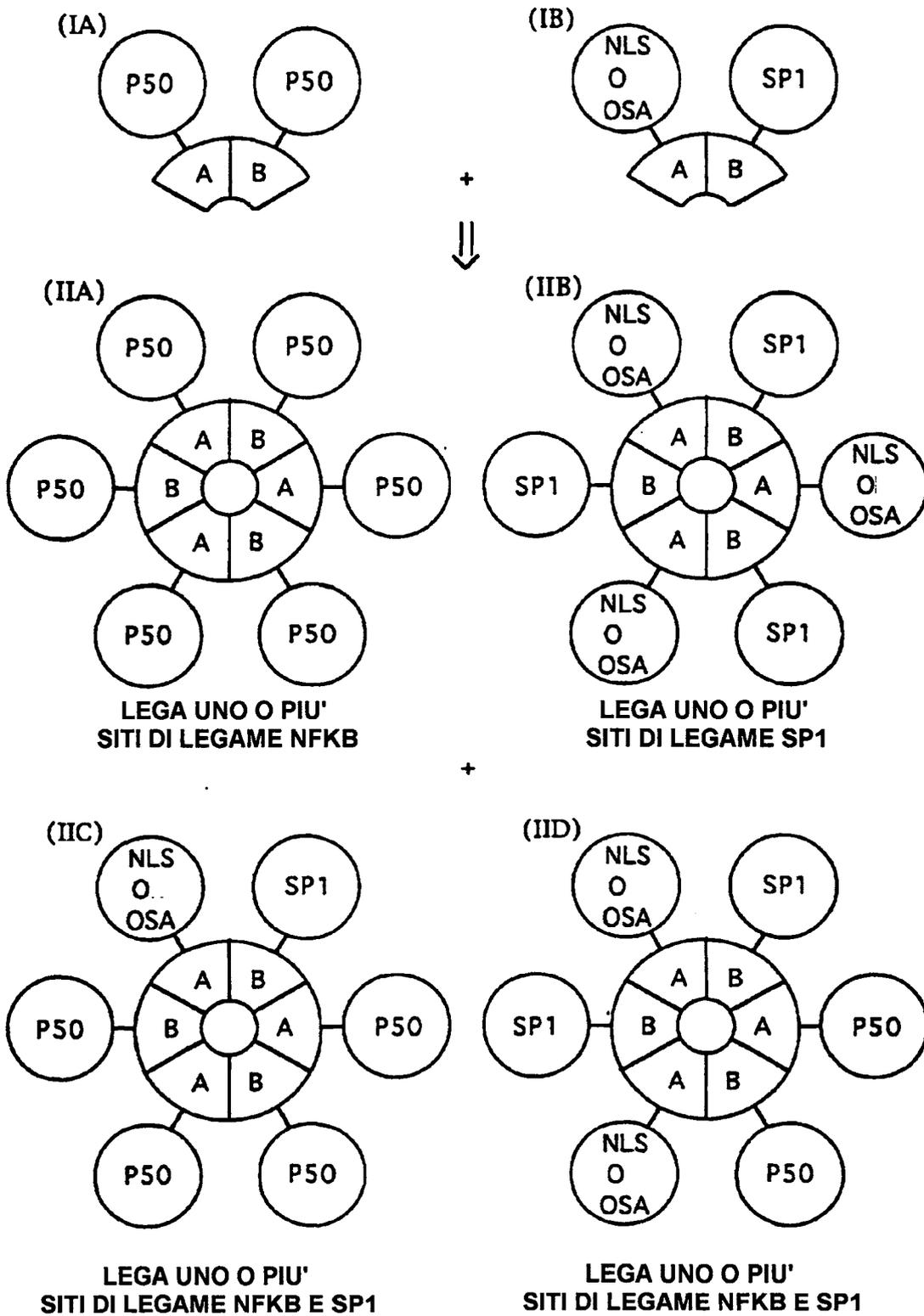


FIGURA 14

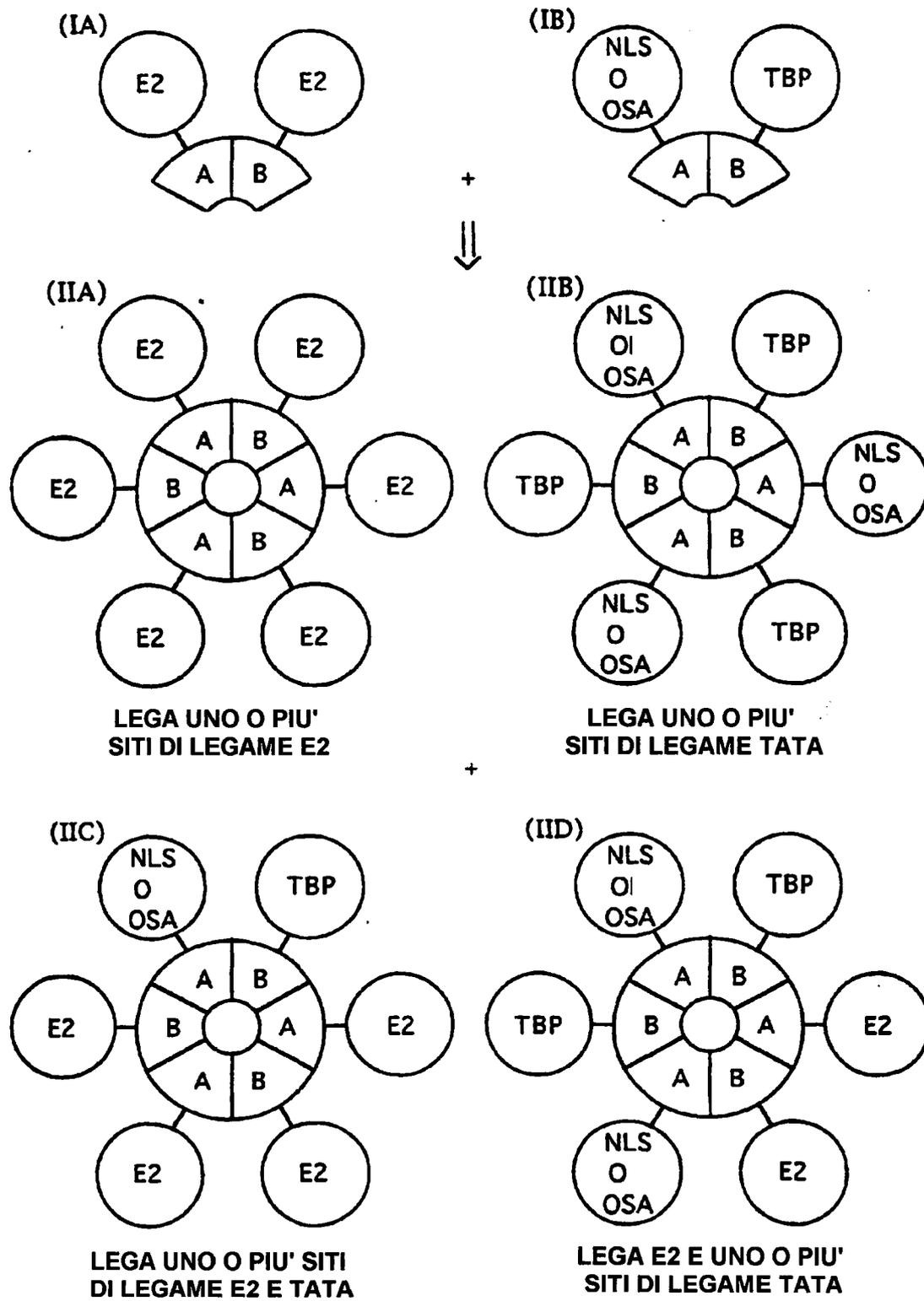


FIGURA 15

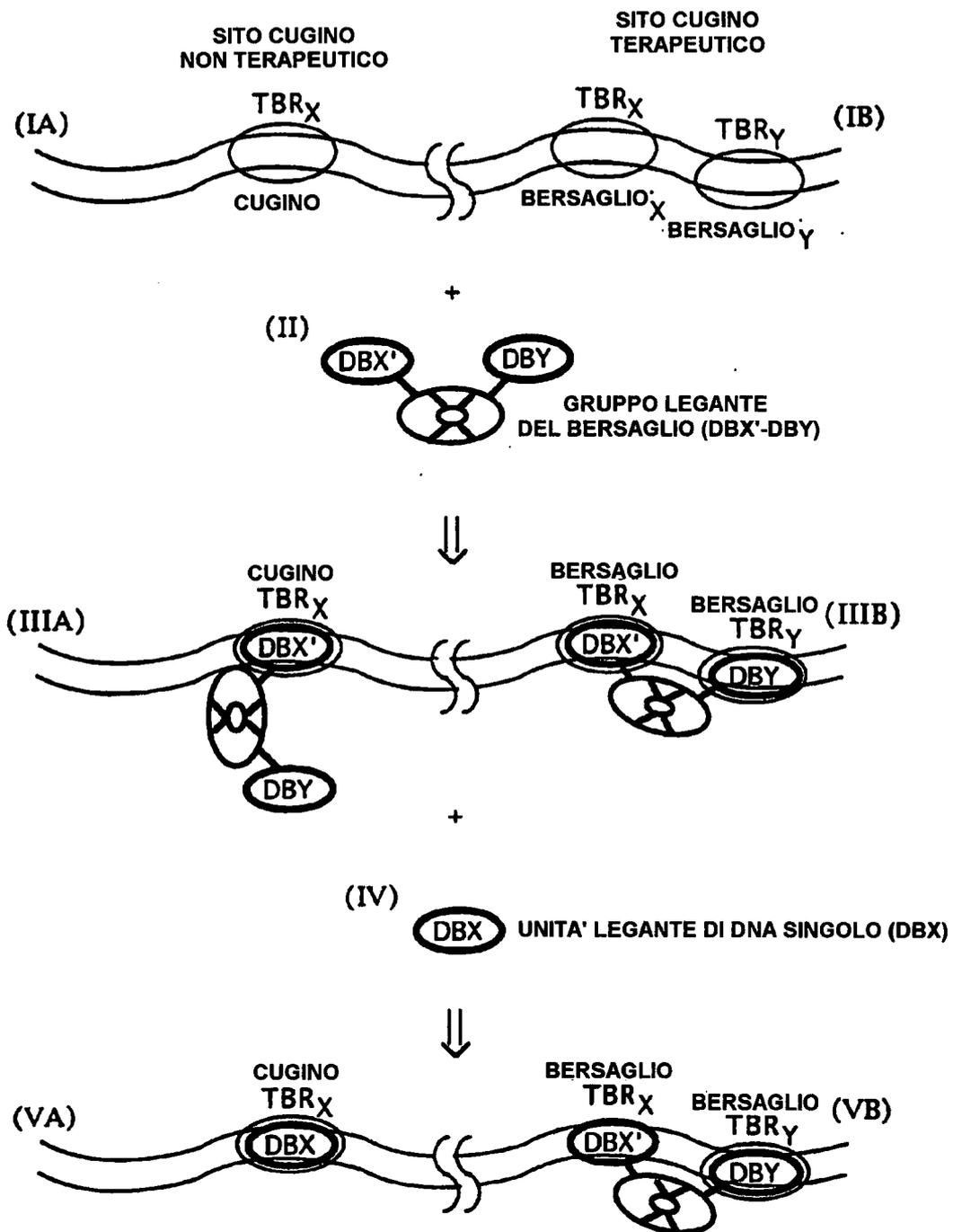


FIGURA 16

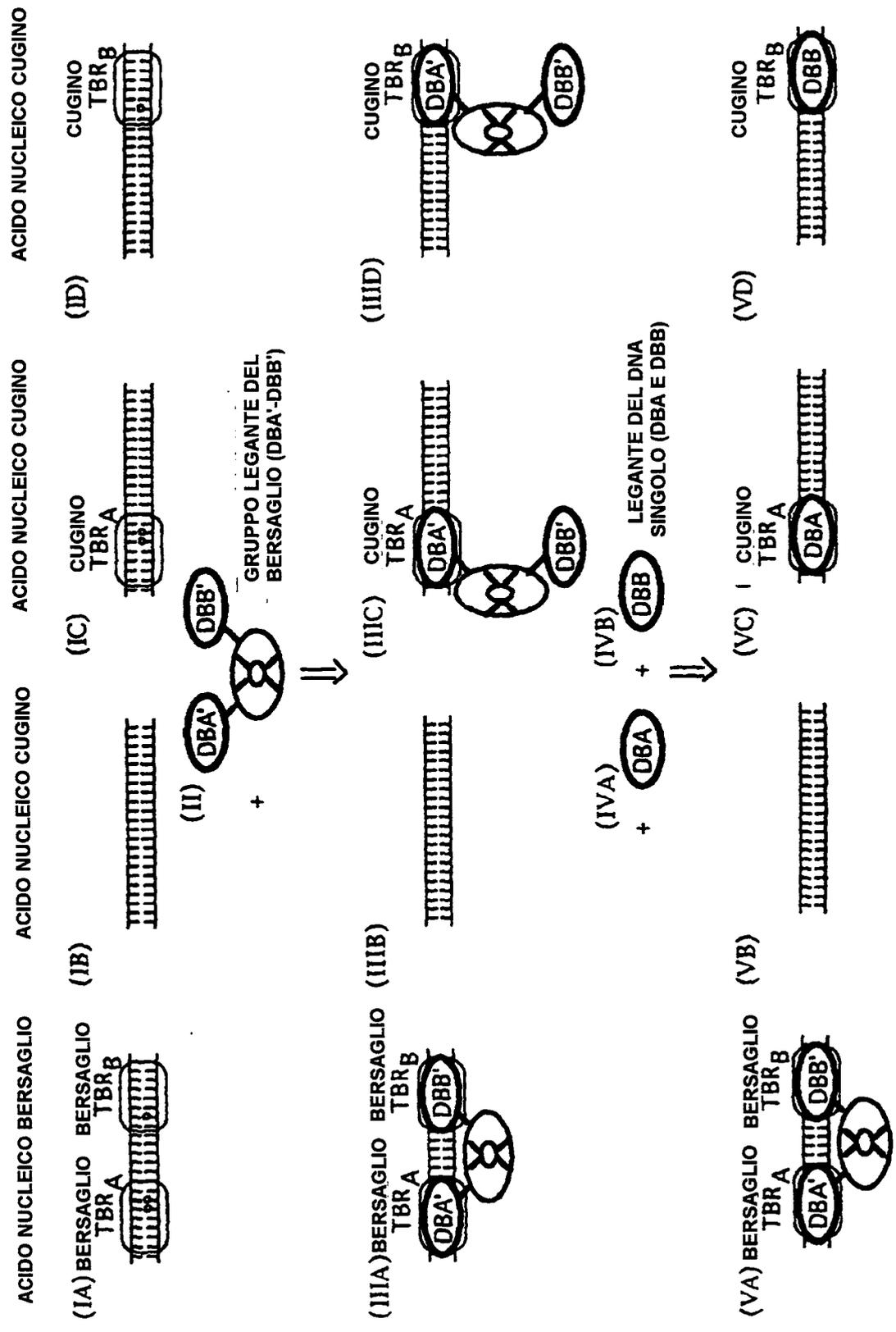


FIGURA 17

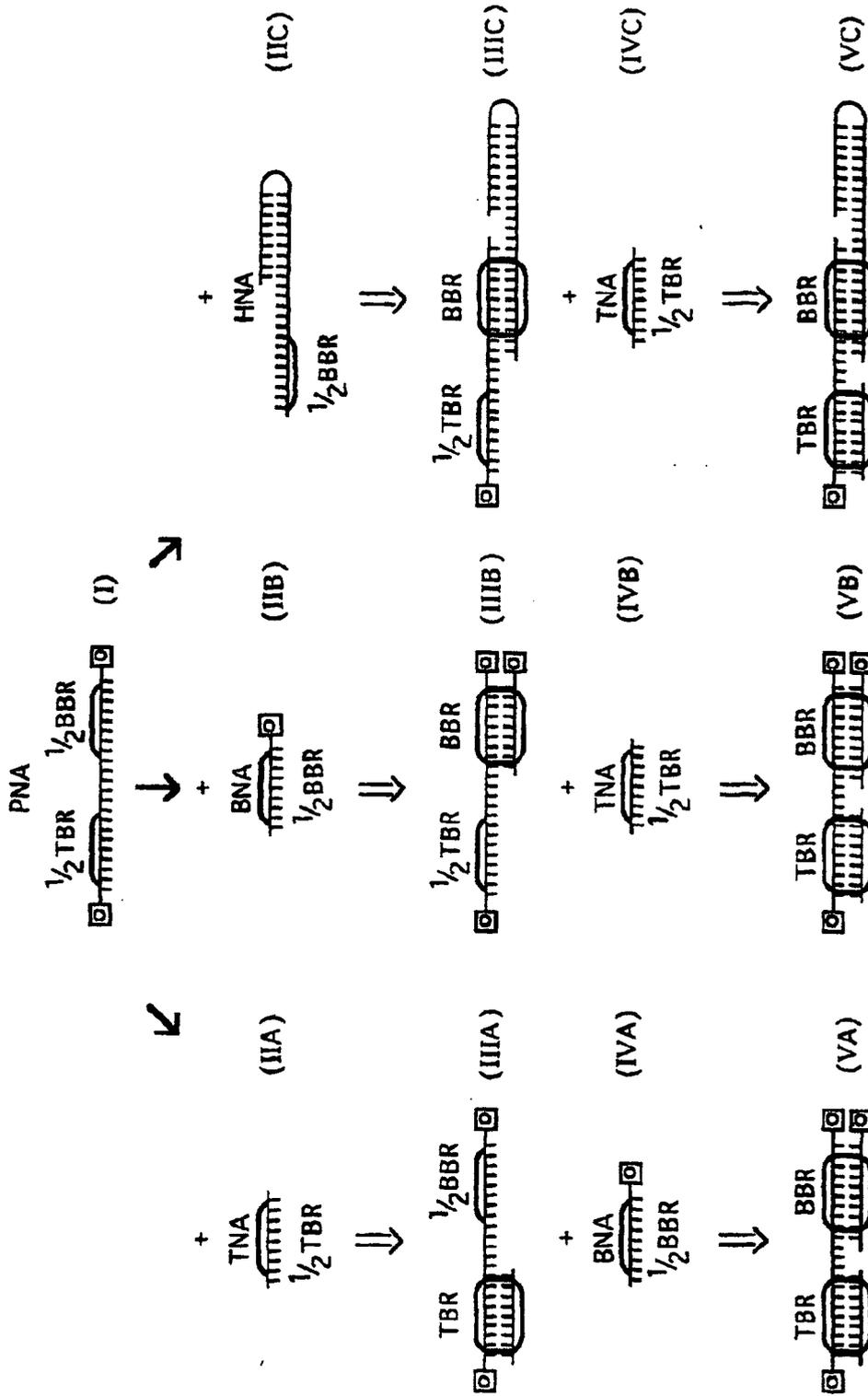


FIGURA 1

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

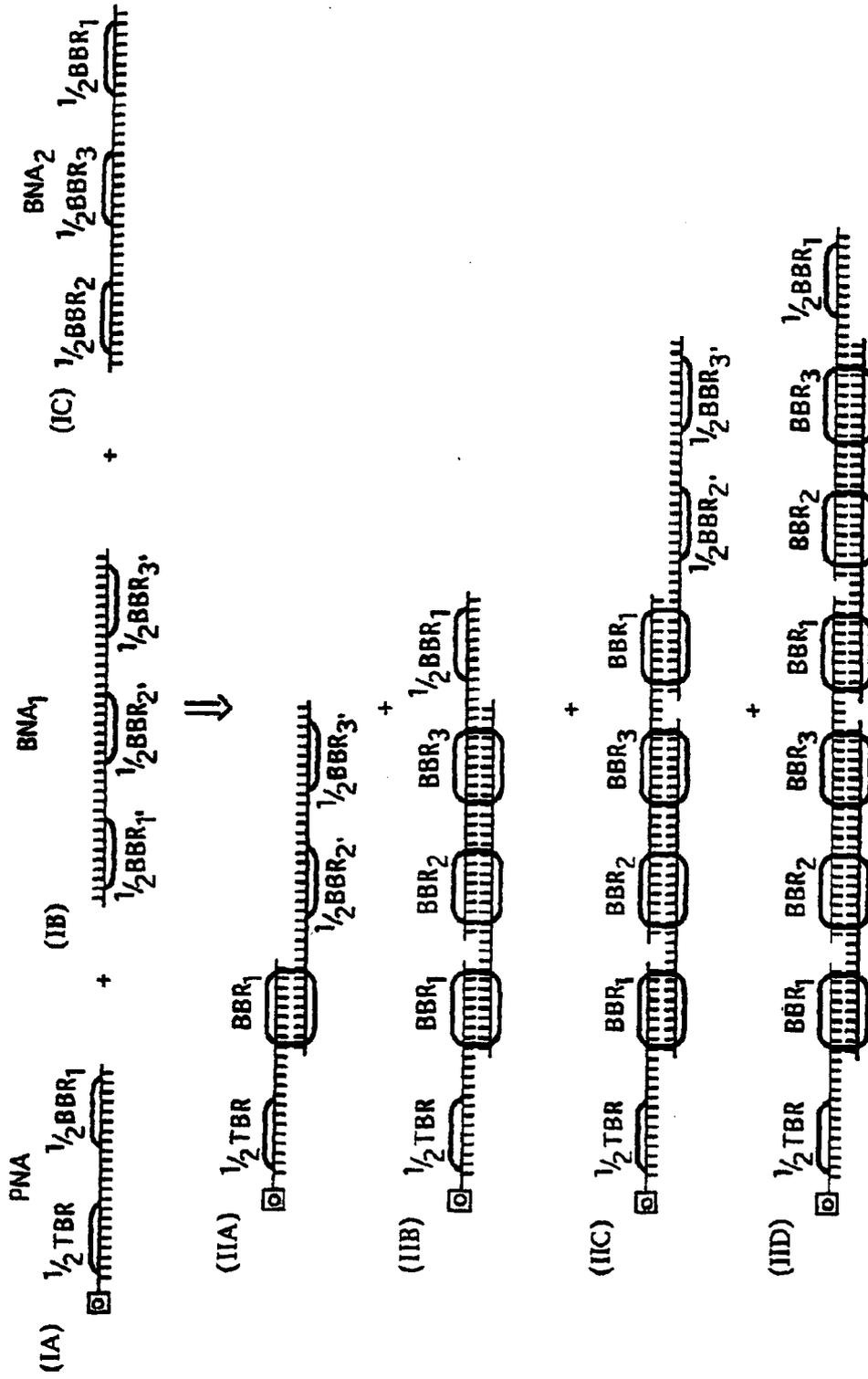


FIGURA 2A

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

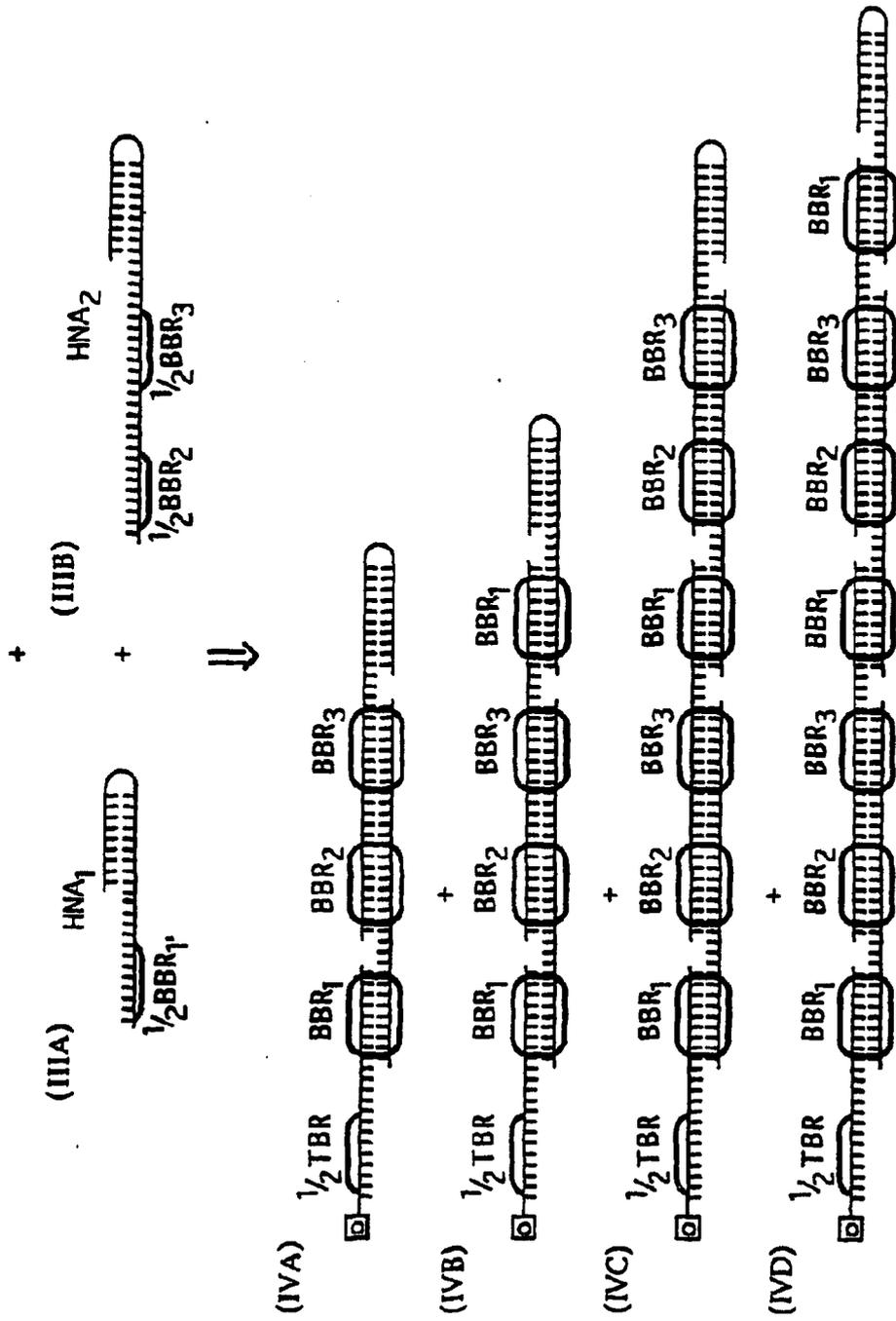


FIGURA 2B

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

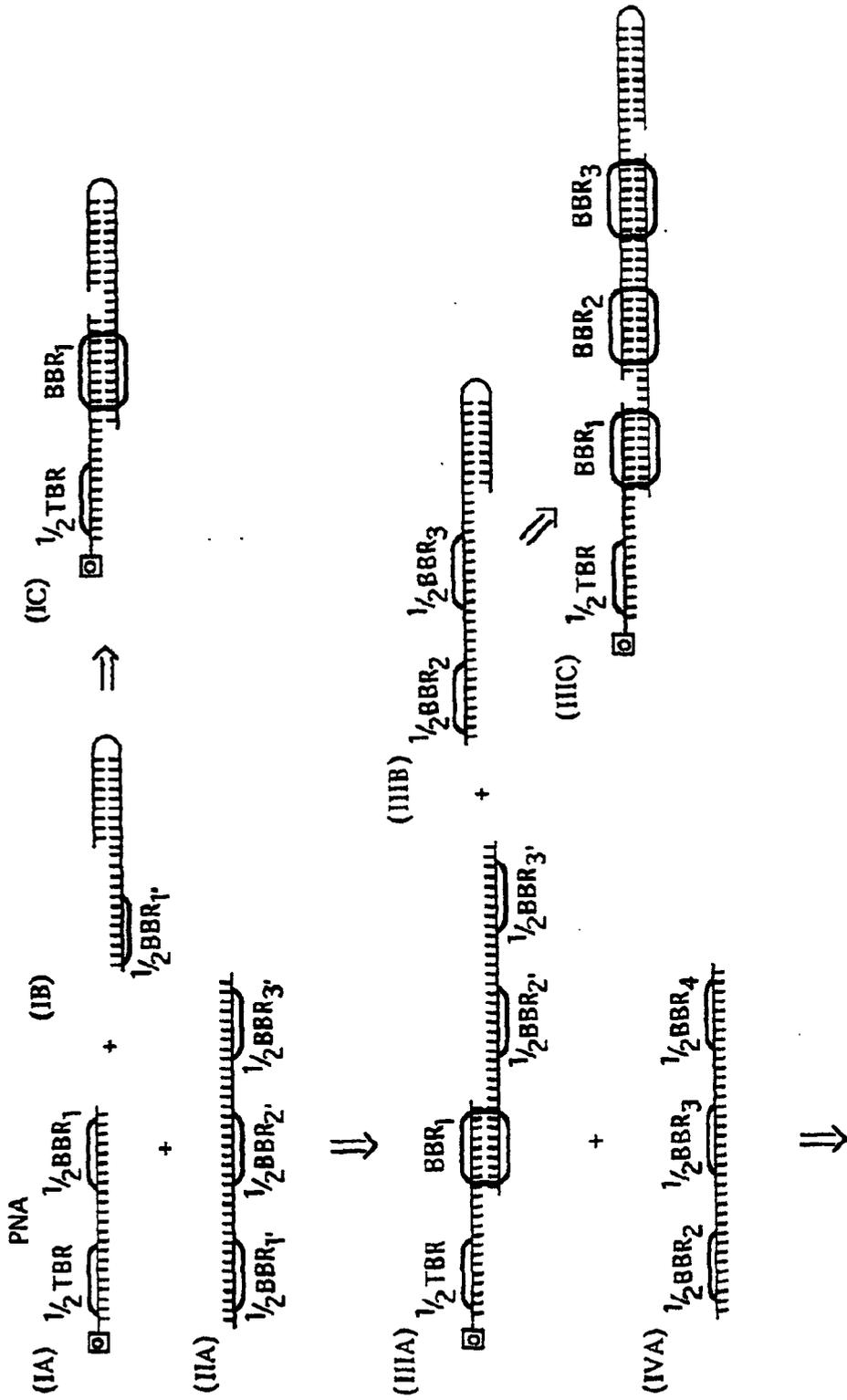


FIGURA 2C

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
 (Iscrizione Albo nr. 843/B)

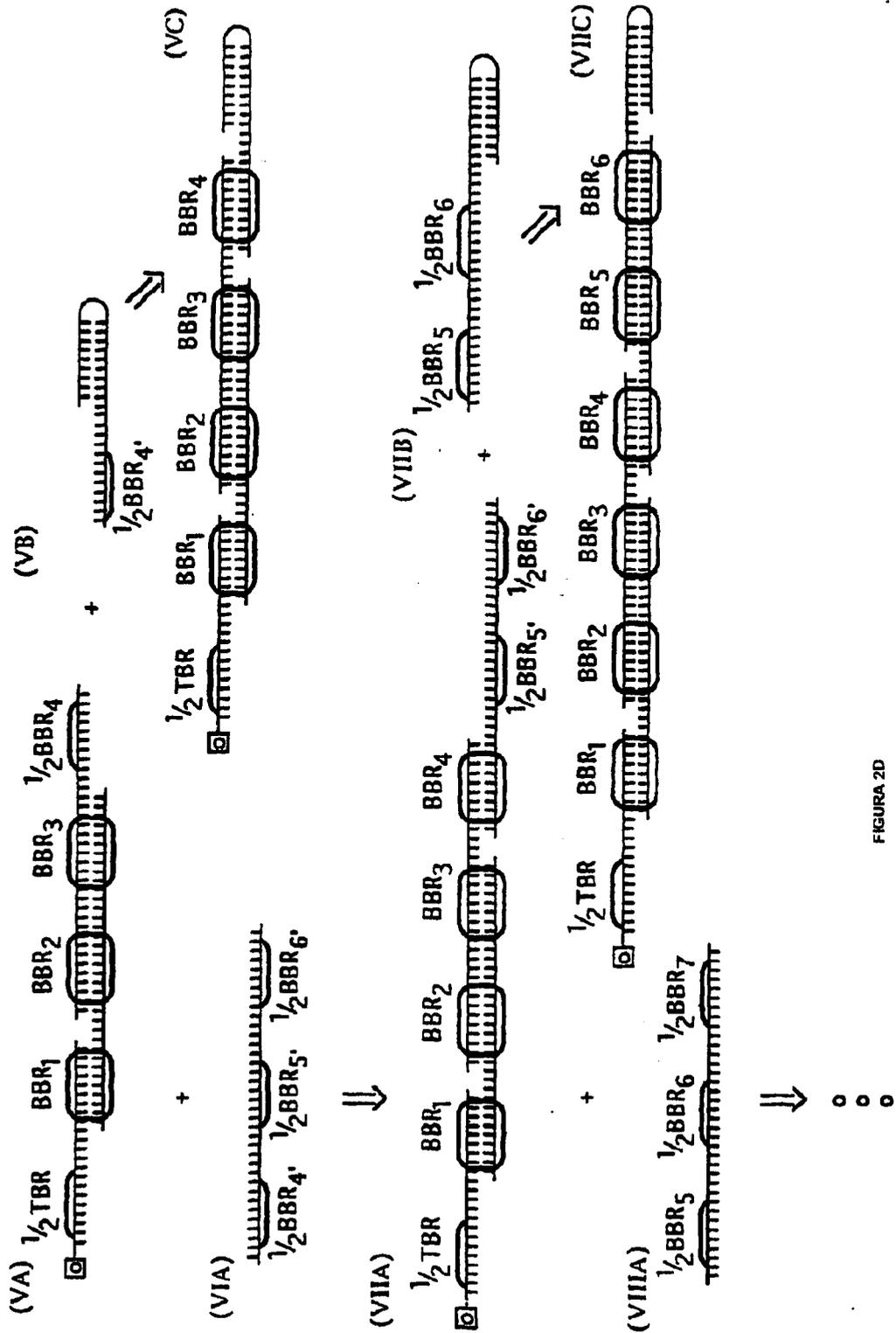


FIGURA 2D

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
 (Iscrizione Albo nr. 843/B)

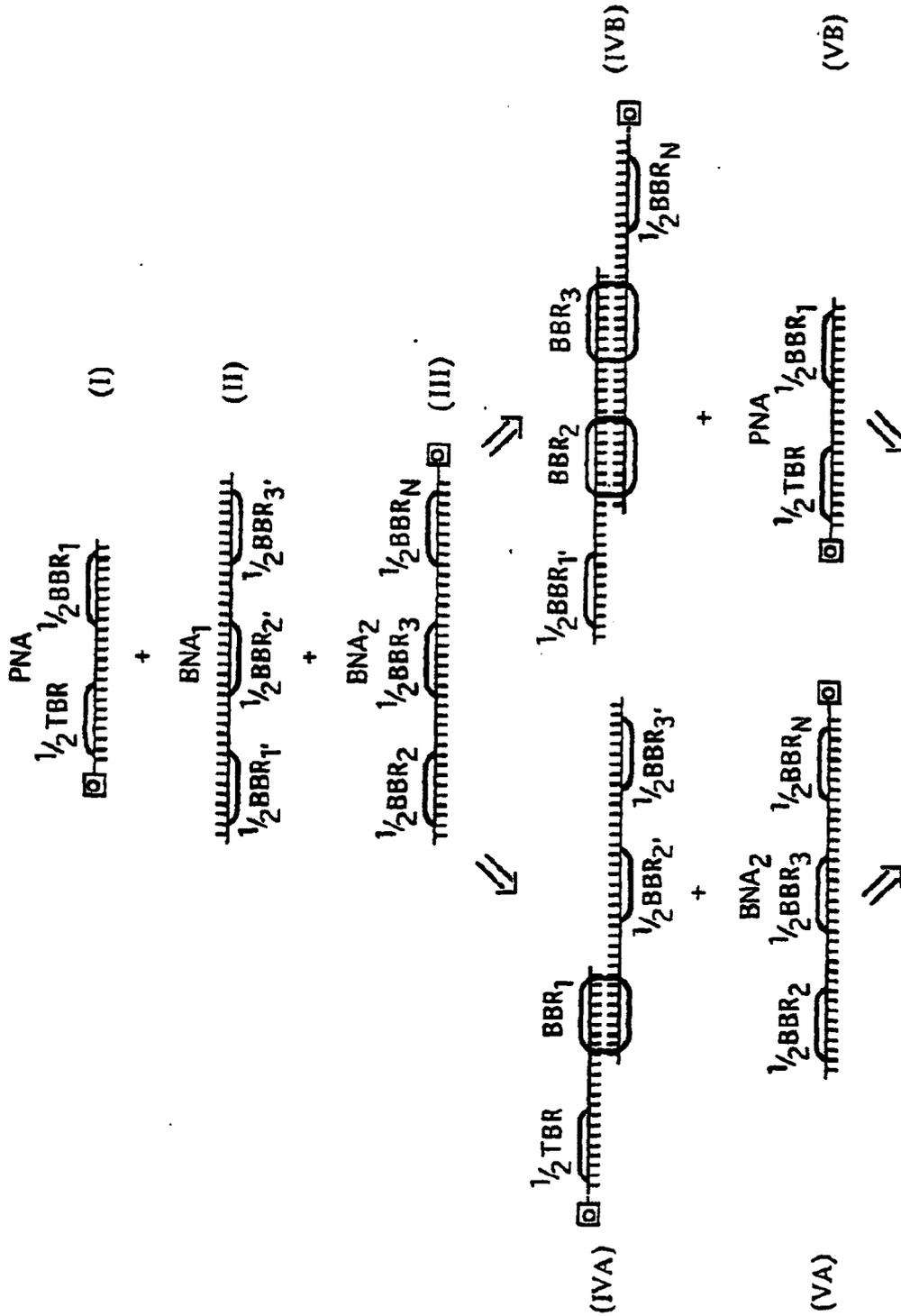


FIGURA 3A

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

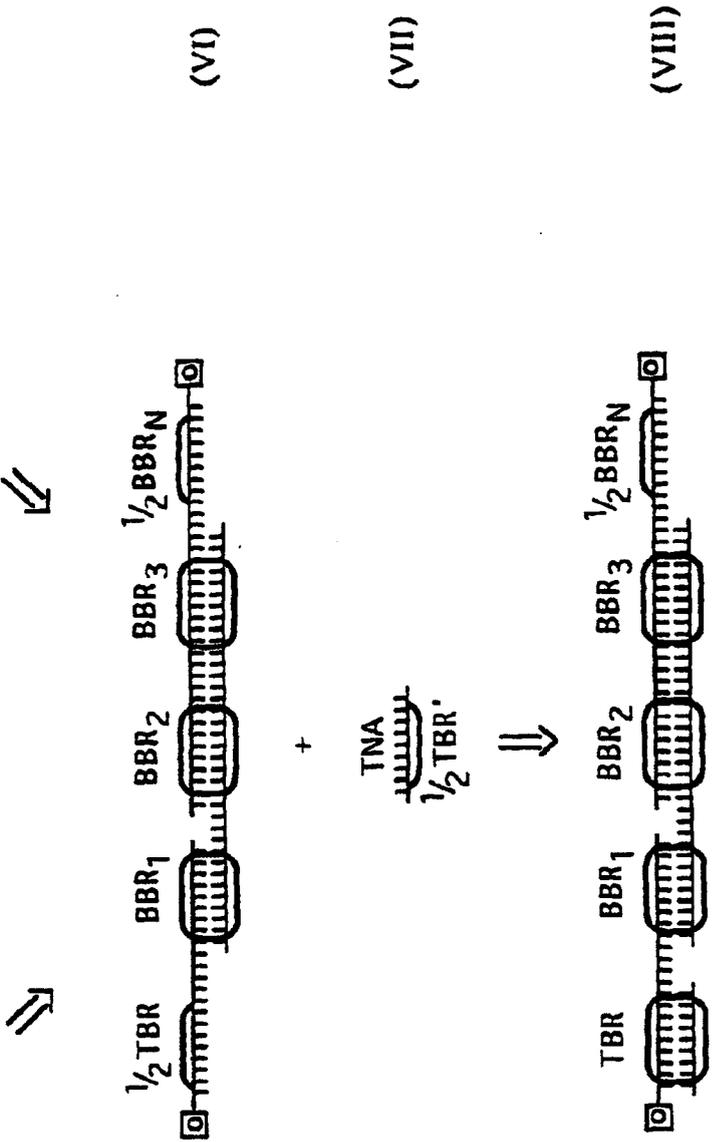


FIGURA 3B

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

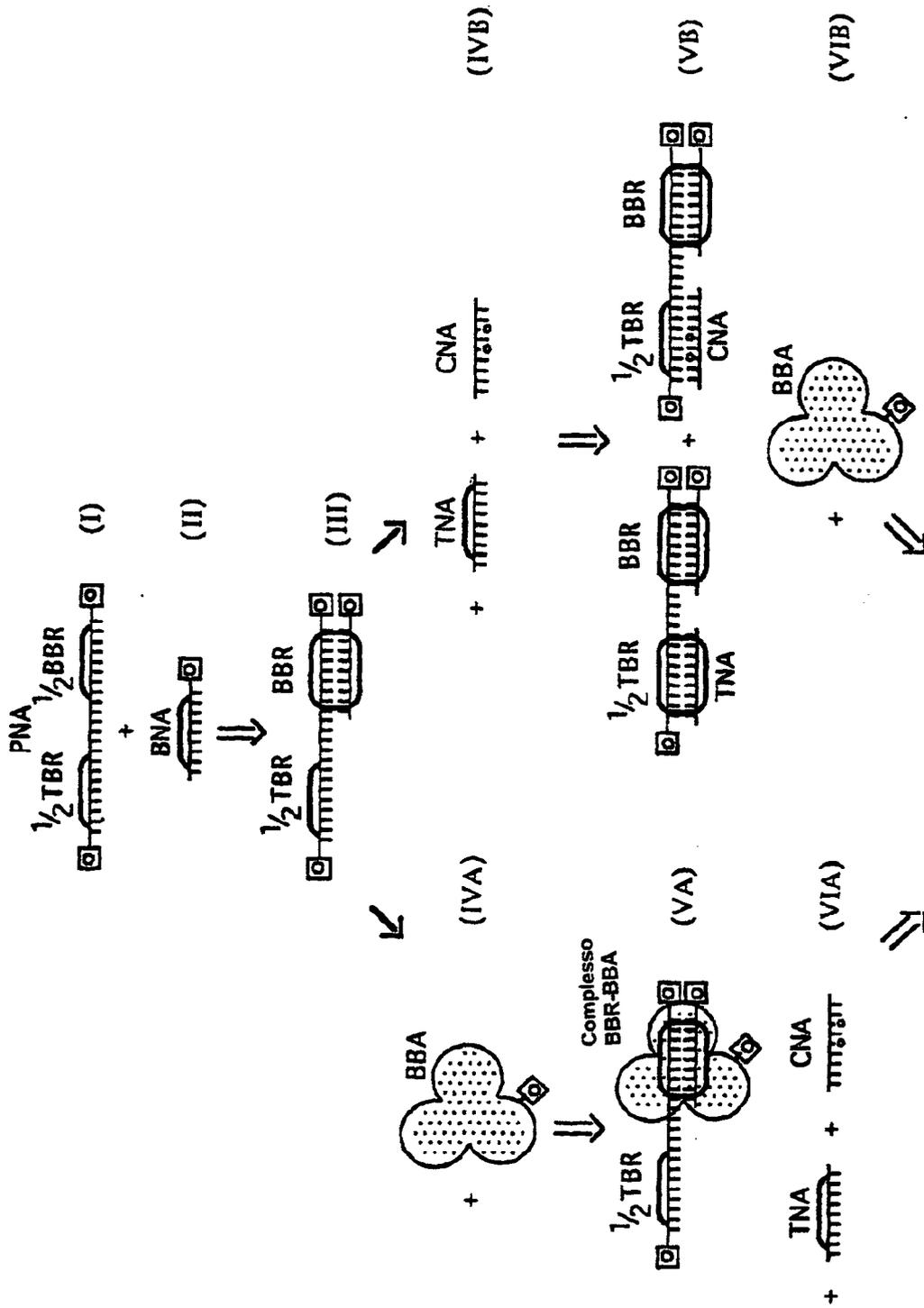


FIGURA 4A

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

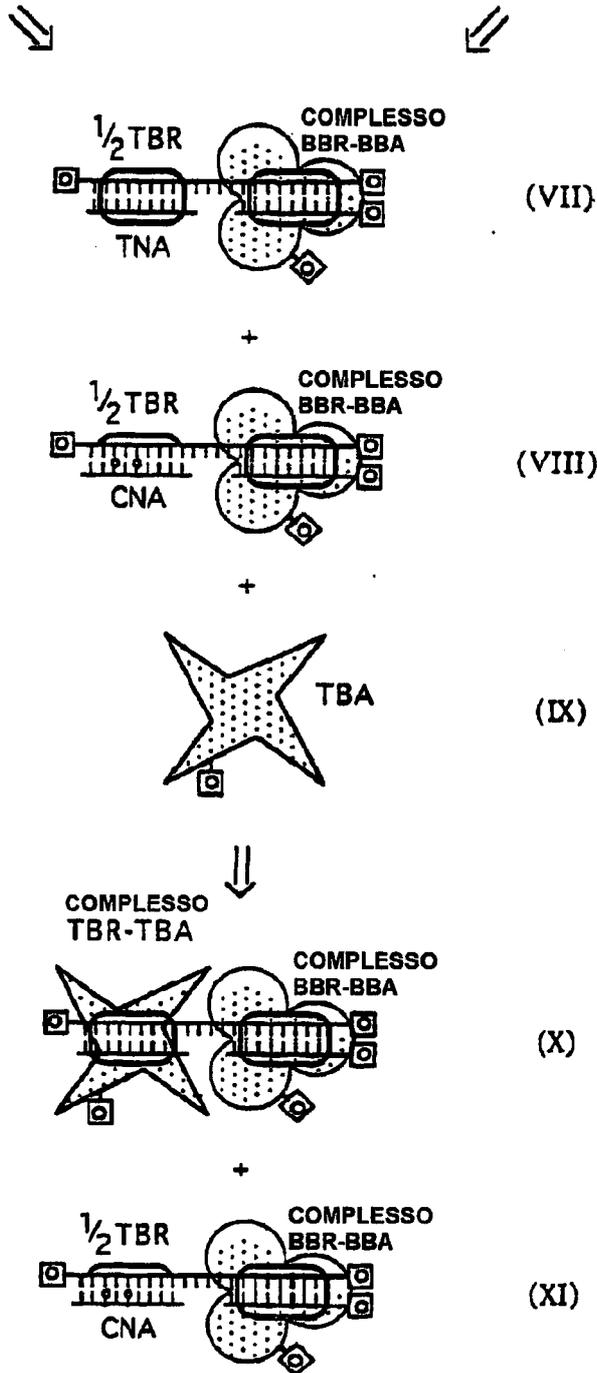


FIGURA 4B

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

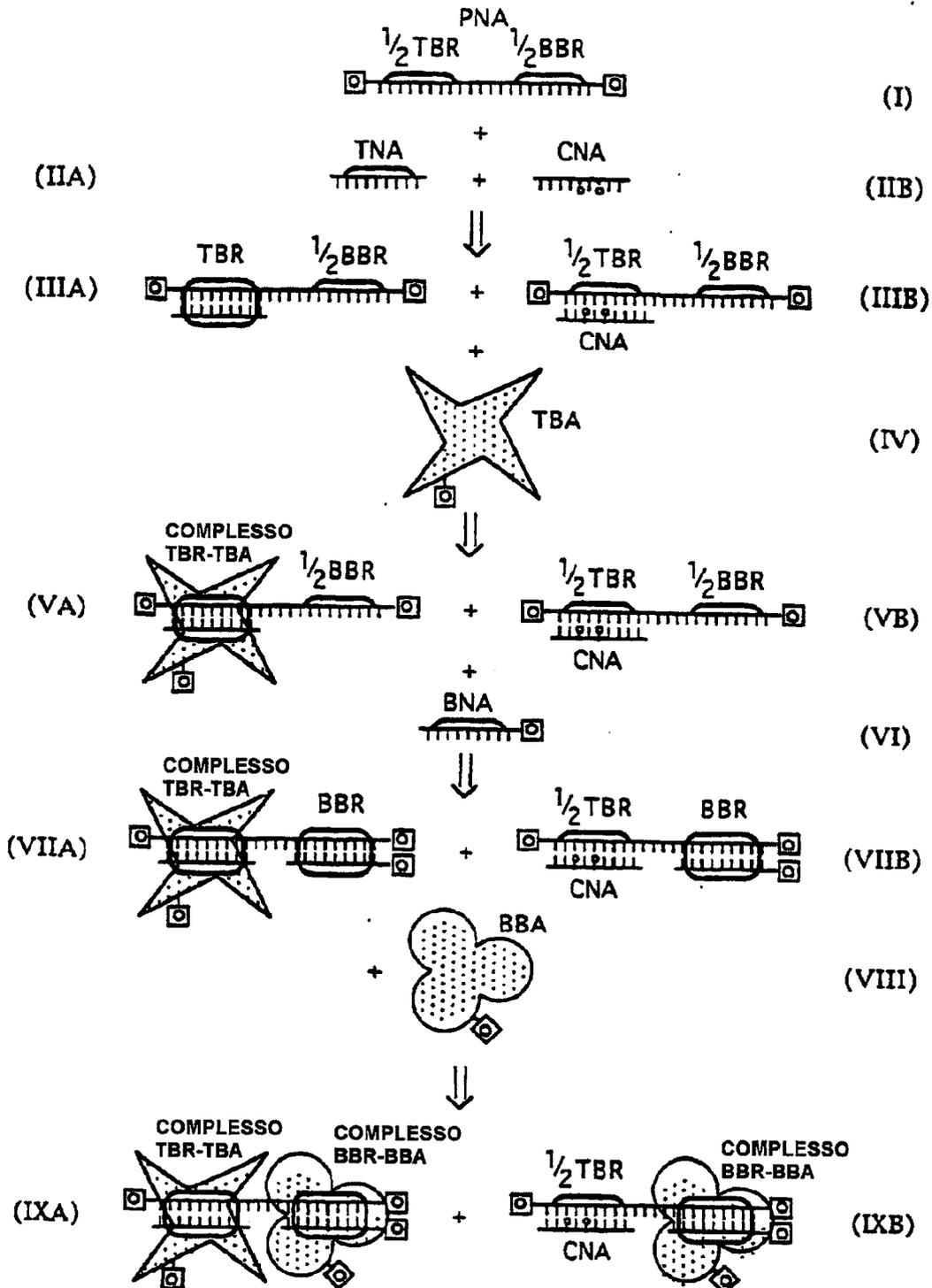


FIGURA 4C

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

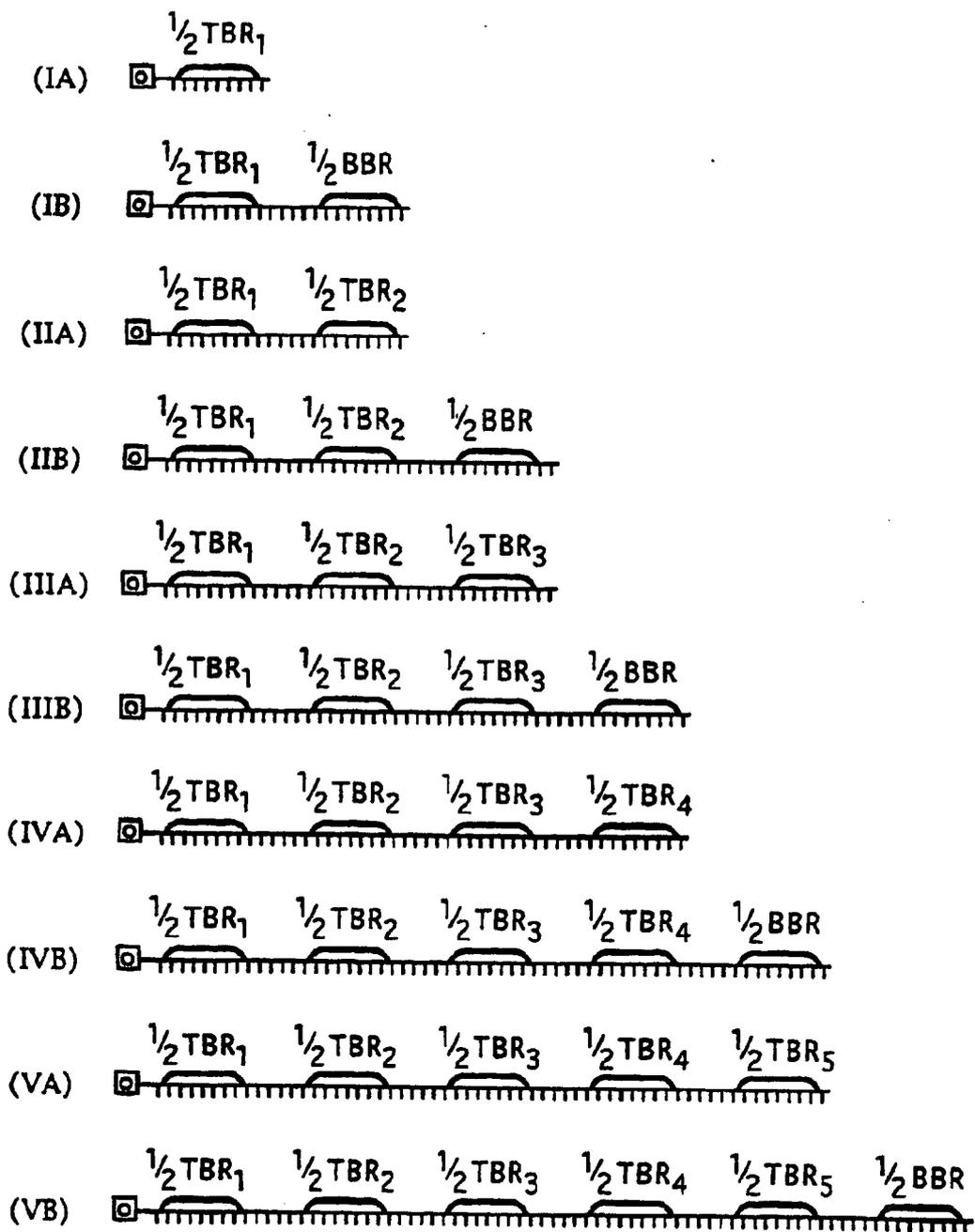


FIGURA 5

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

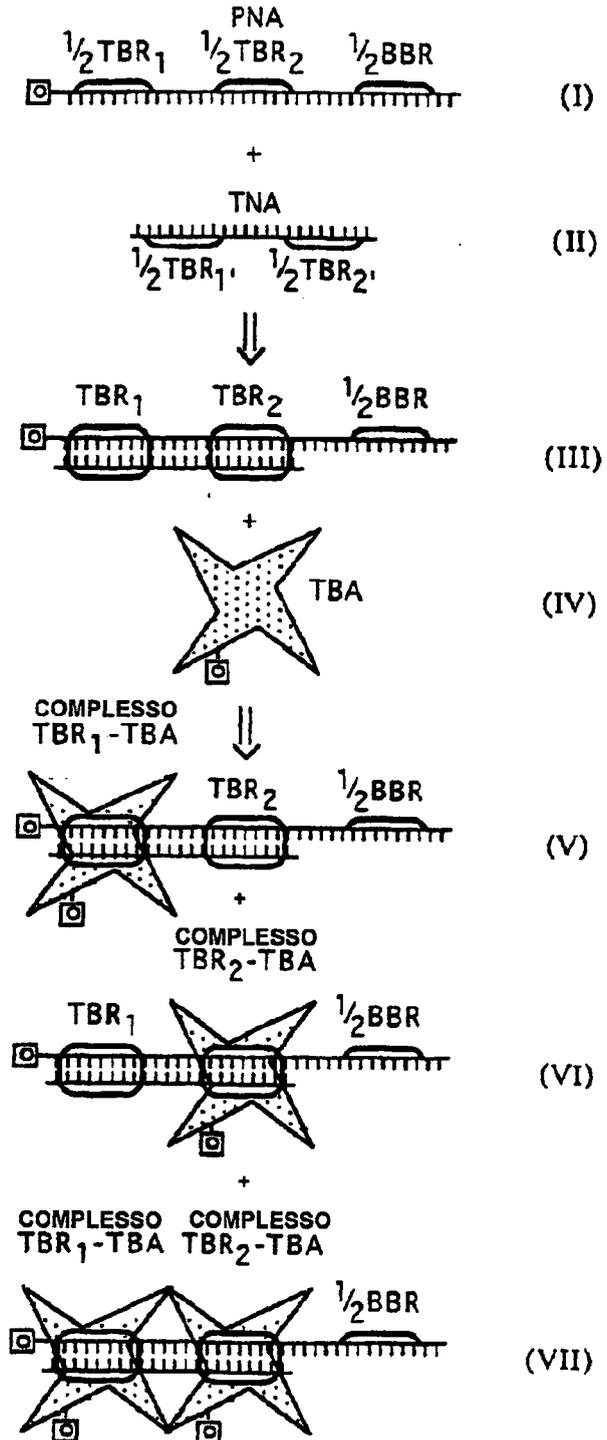


FIGURA 6A

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

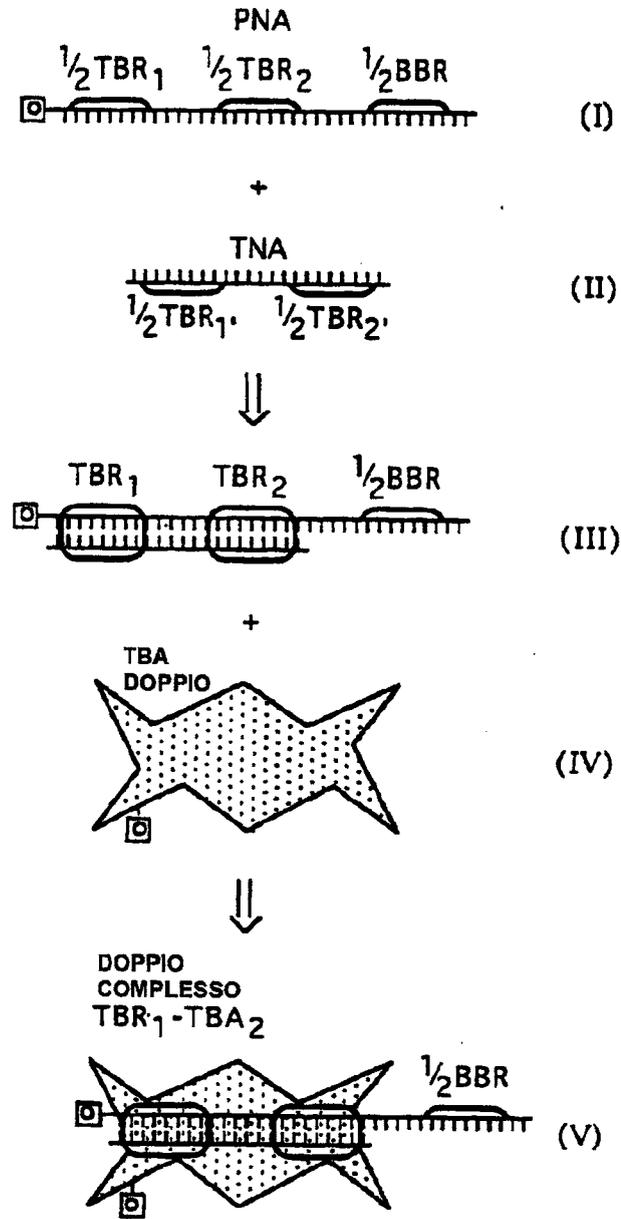


FIGURA 6B

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

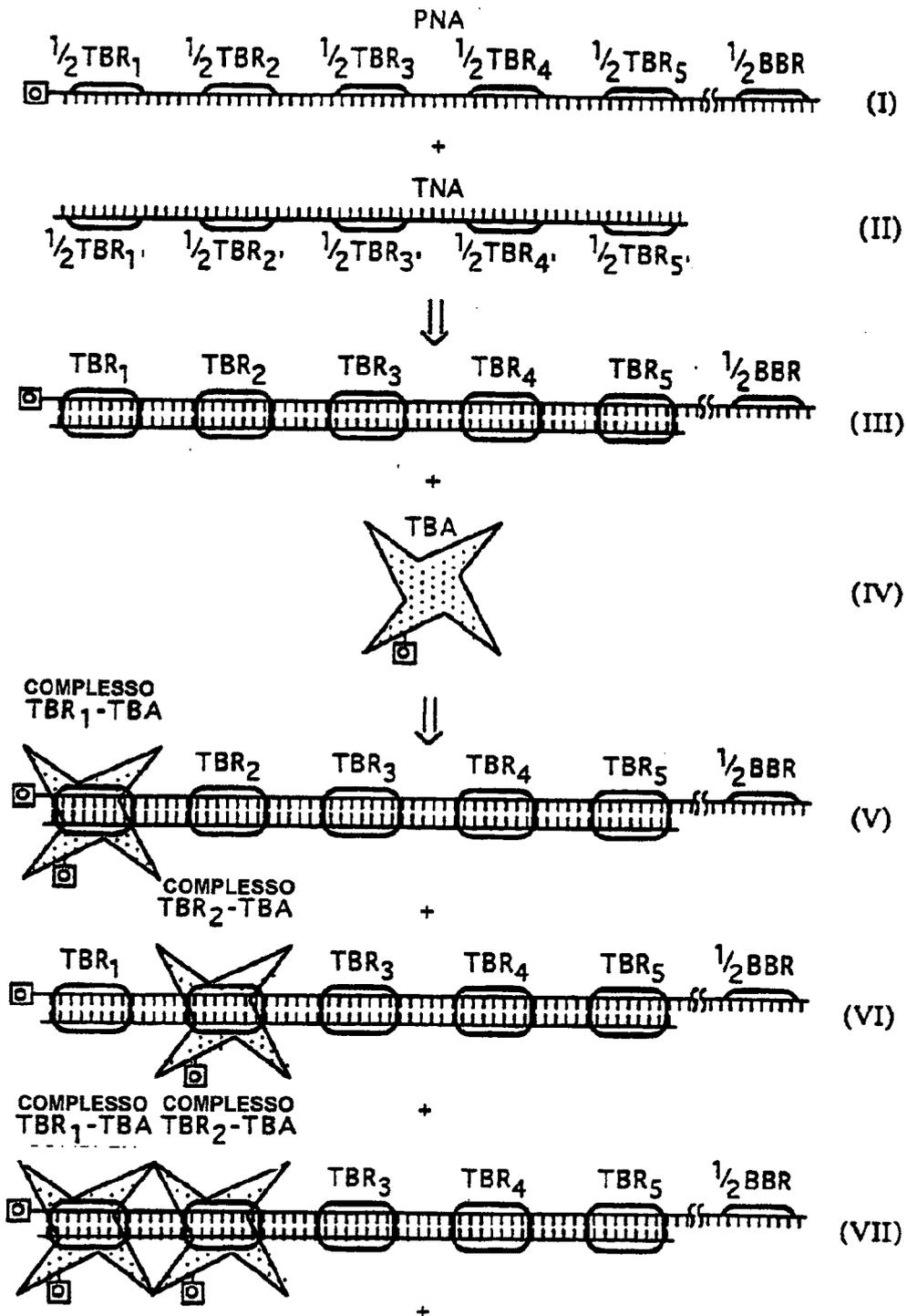


FIGURA 6C

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

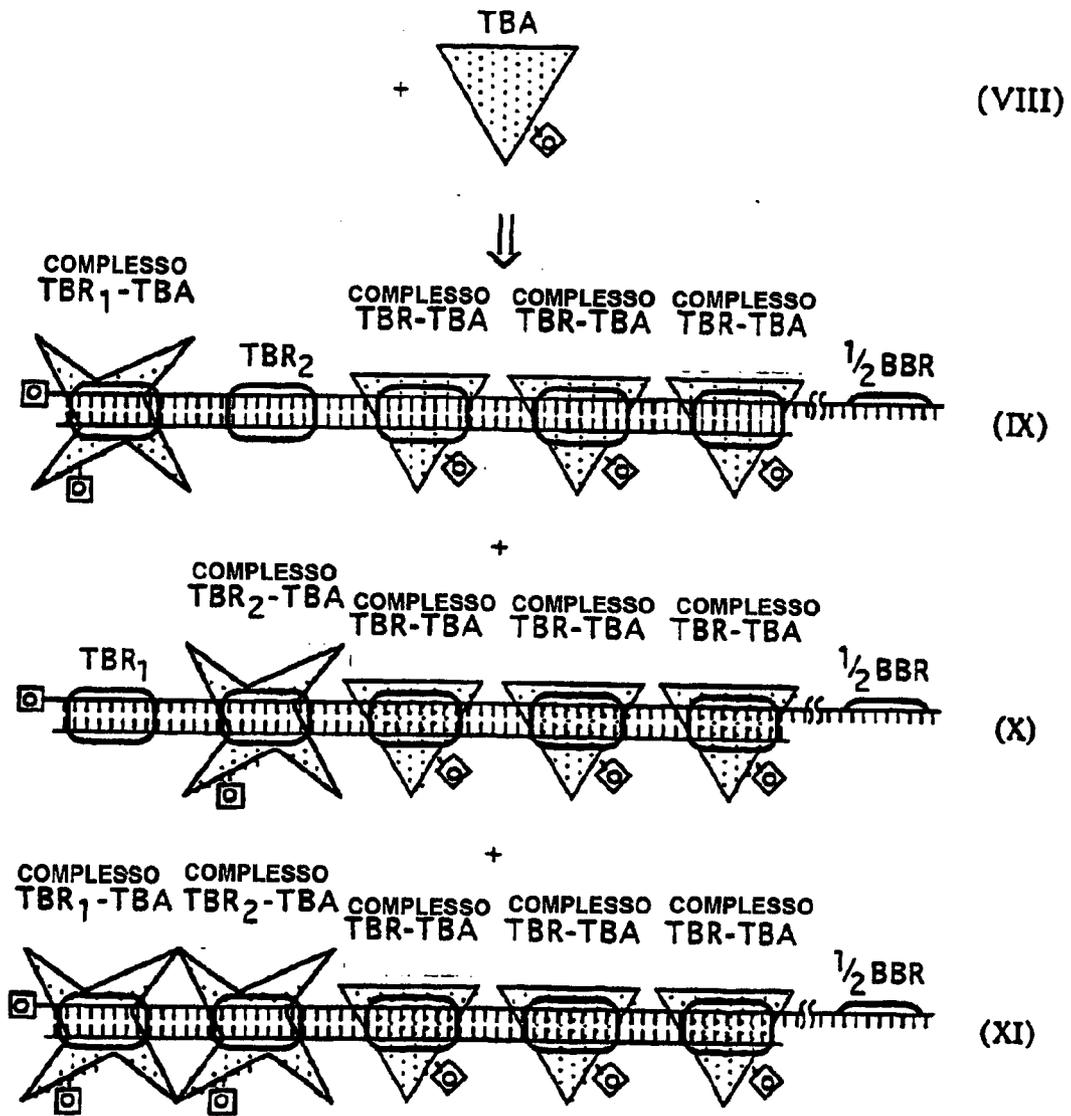


FIGURA 6D

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

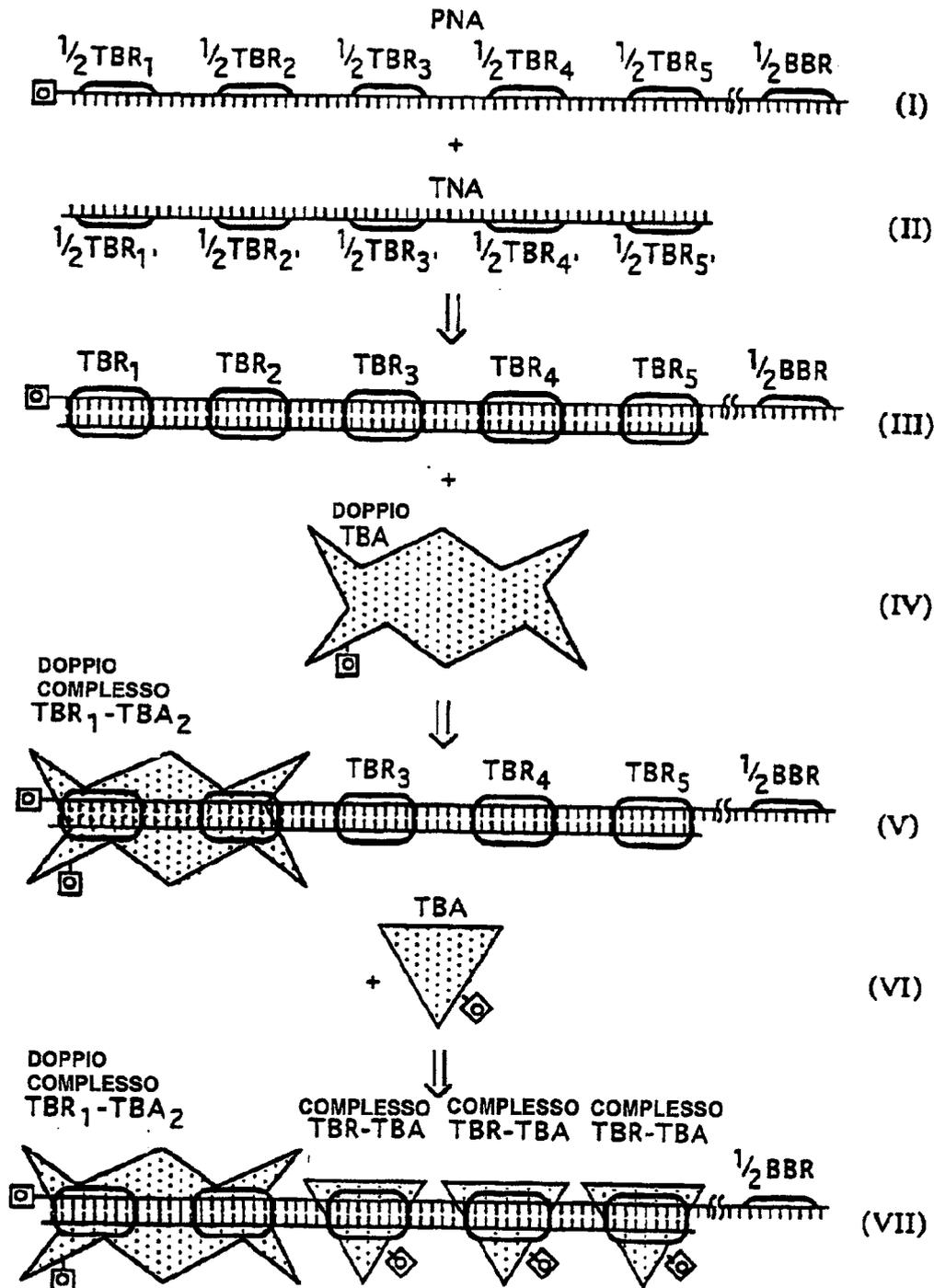


FIGURA 6E

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

SEQ. ID: 37:

12345678901234567890123456789012345678901234567890
 CTACAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGGAGGCGTGGCCTGGGCGGGACTGGGGAGTGGCGTCCC
 ++++++
 NF-kB NF-kB SP1 SP1 SP1

Kit di prova HIV PNA1 (+++ da prima), sequenza identificazione: 38:

CTACAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGGAGG

Kit di prova HIV PNA2 (=== da prima), sequenza identificazione: 39:

###CGGGACTGGGGAGTGGCGTCCC###

La sequenza terminale adesiva di PNA2 è complementare a una delle estremità del DNA operatore formata tra:

###OL1-OL2-OL3
 OL1'-OL2'-OL3'***

or

###OR3-OR2-OR1
 OR3'-OR2'-OR1'***

FIGURA 7

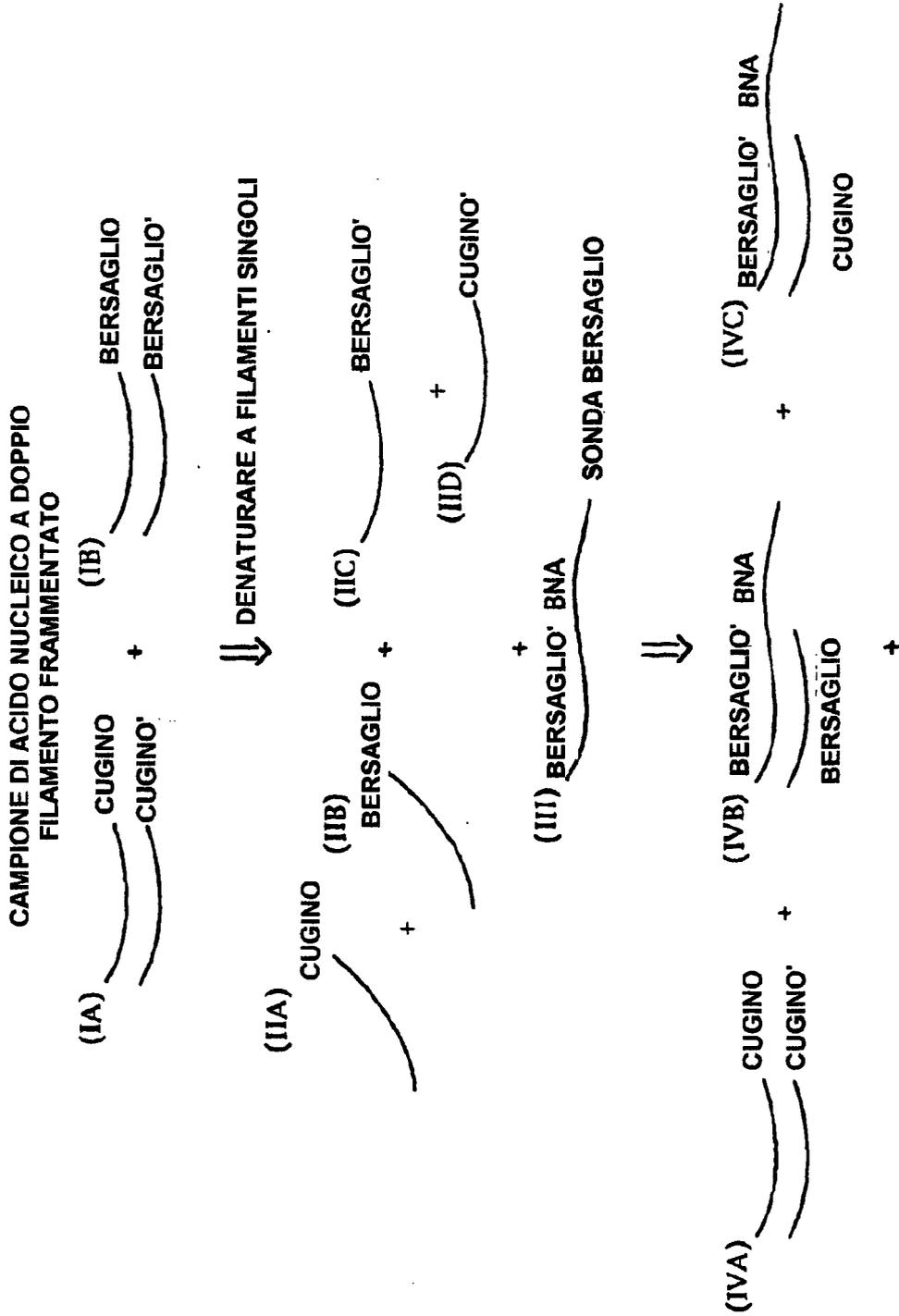


FIGURA 8A

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

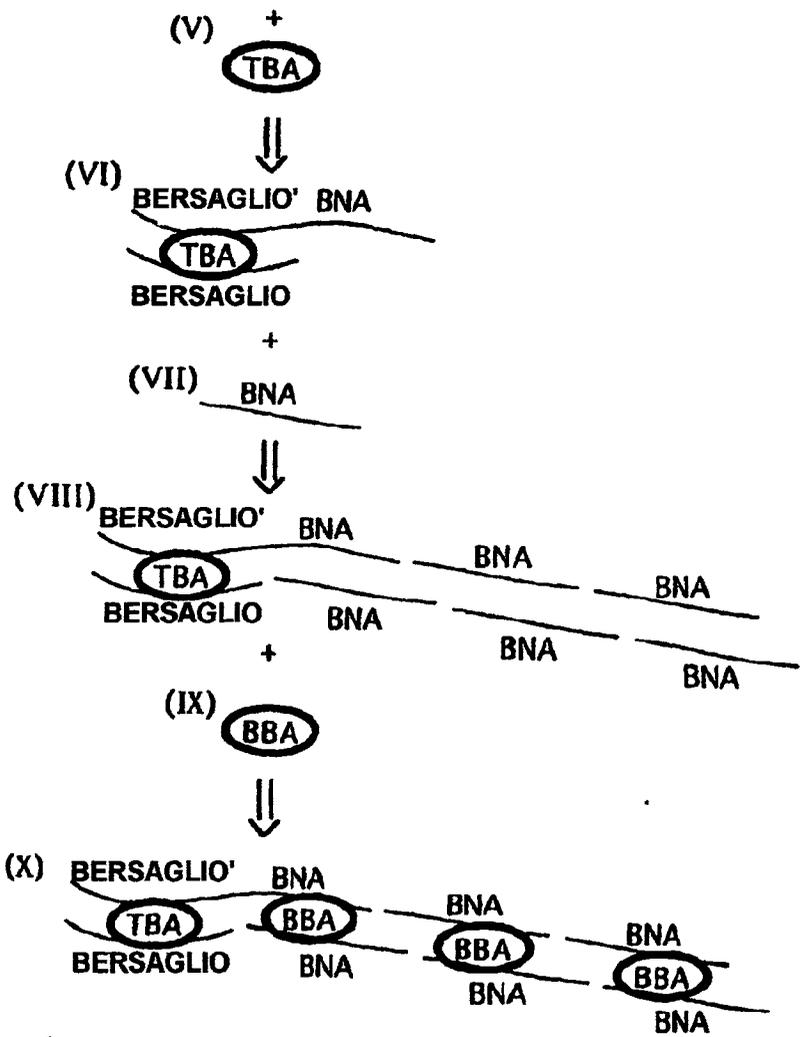


FIGURA 8B

Caso 5248EPIIT

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
 (Iscrizione Albo nr. 843/B)

TBA: GRUPPO DI LEGAME DEL BERSAGLIO

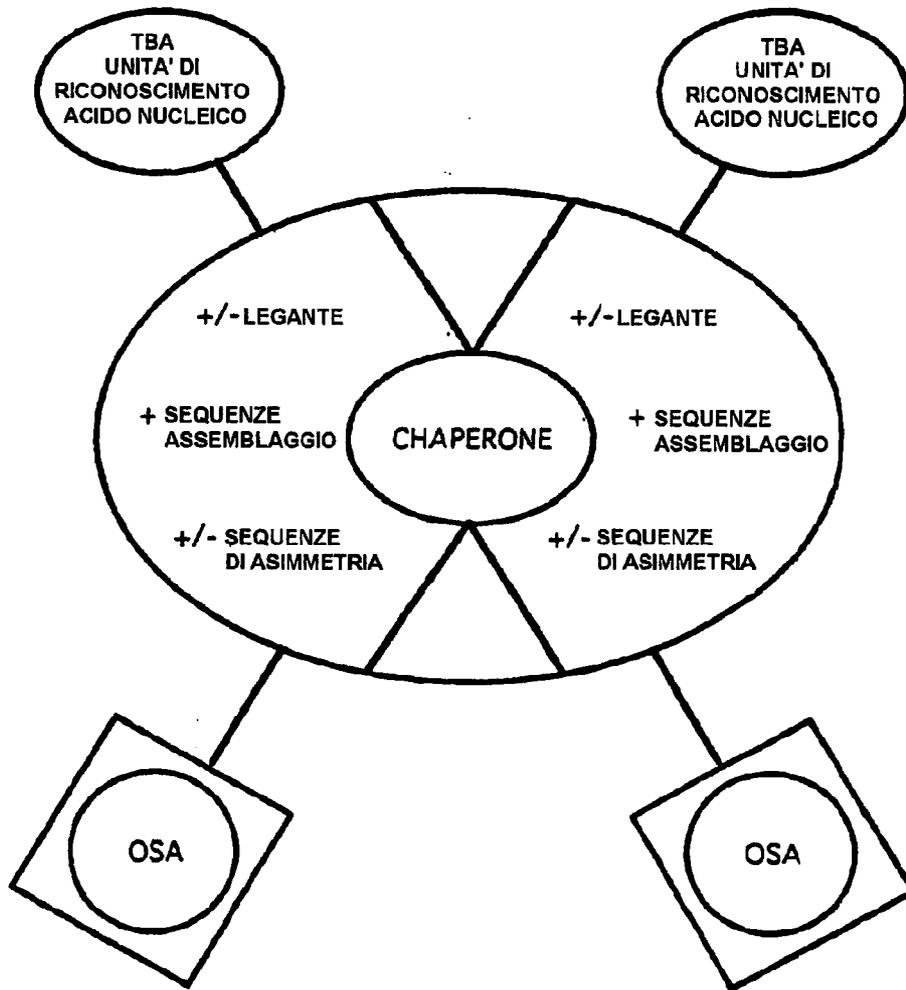
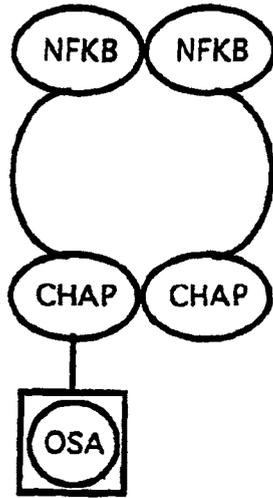


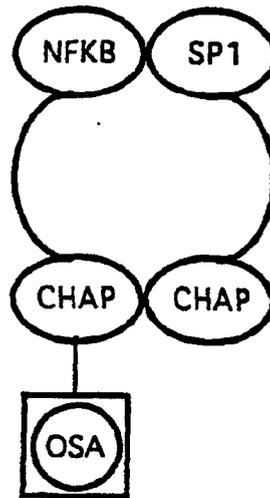
FIGURA 9

p.i.: THE GENE POOL, INC.

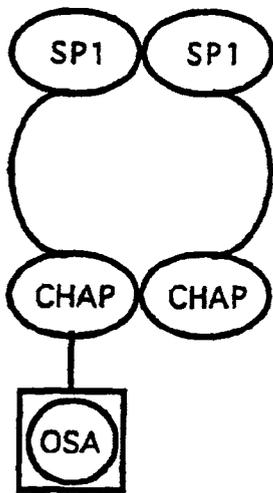
Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)



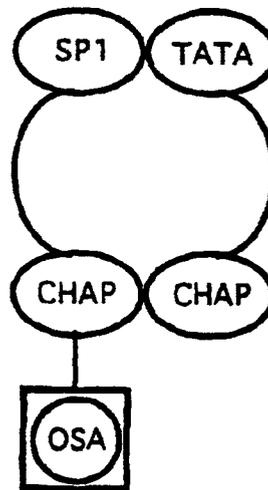
HIV-DETECT I



HIV-DETECT II



HIV-DETECT III

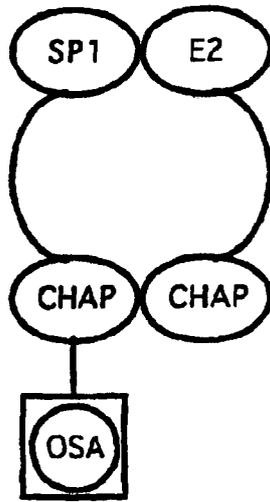


HIV-DETECT IV

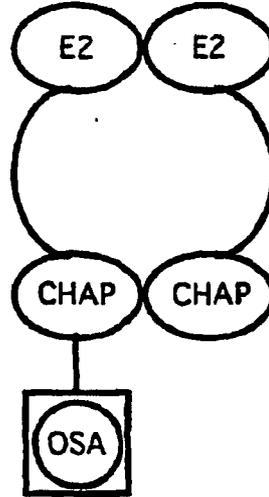
FIGURA 10

p.i.: THE GENE POOL, INC.

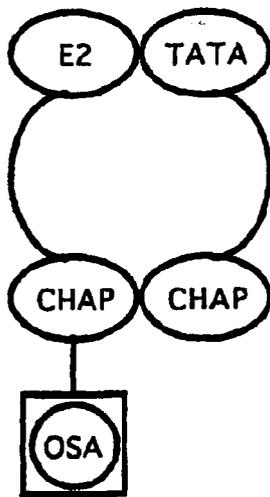
Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)



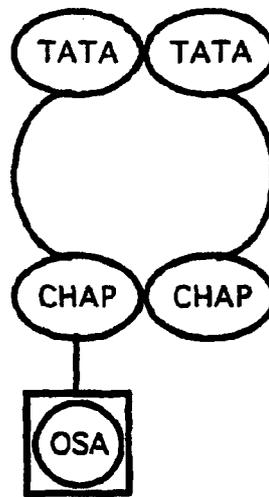
HPV-DETECT I



HPV-DETECT II



HPV-DETECT III



HPV-DETECT IV

FIGURA 11

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

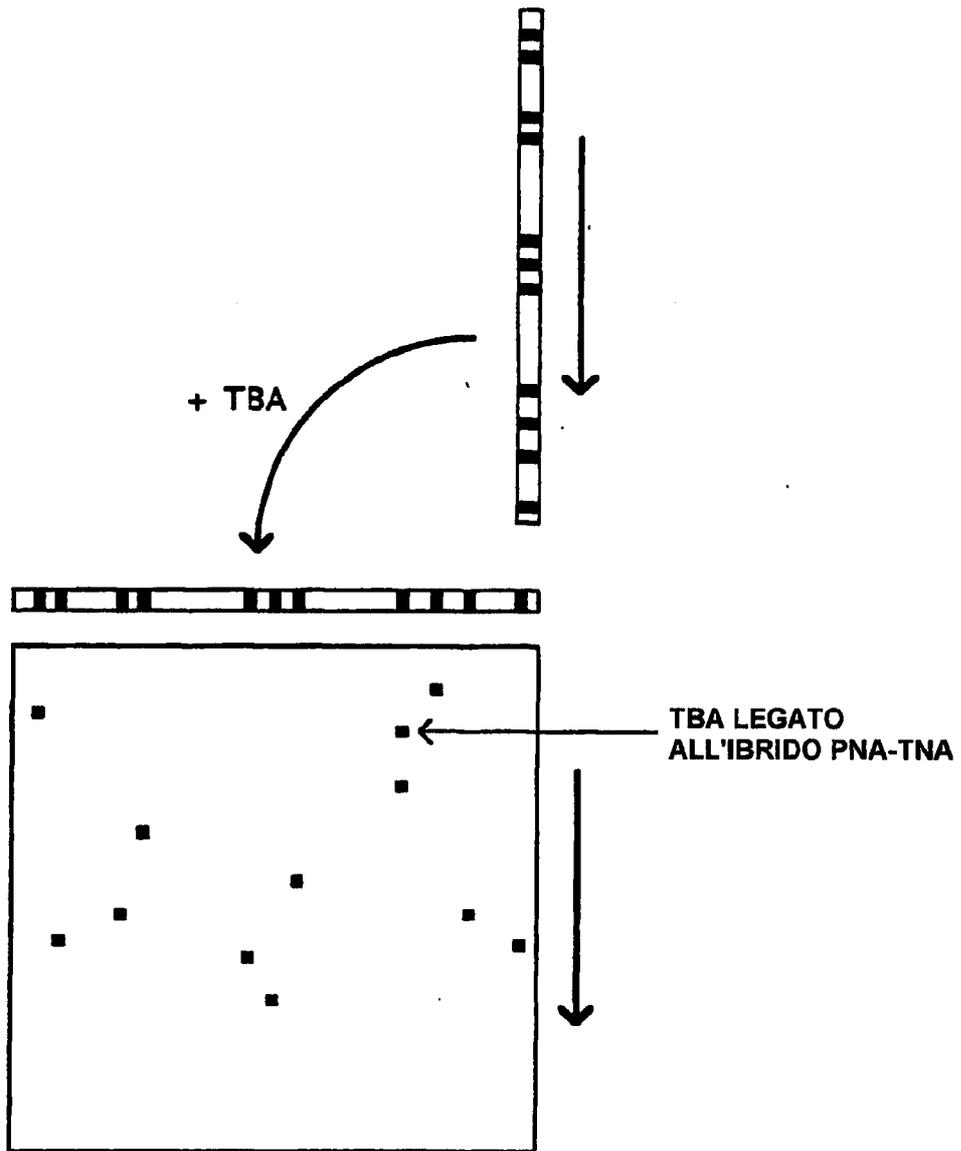


FIGURA 12A

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

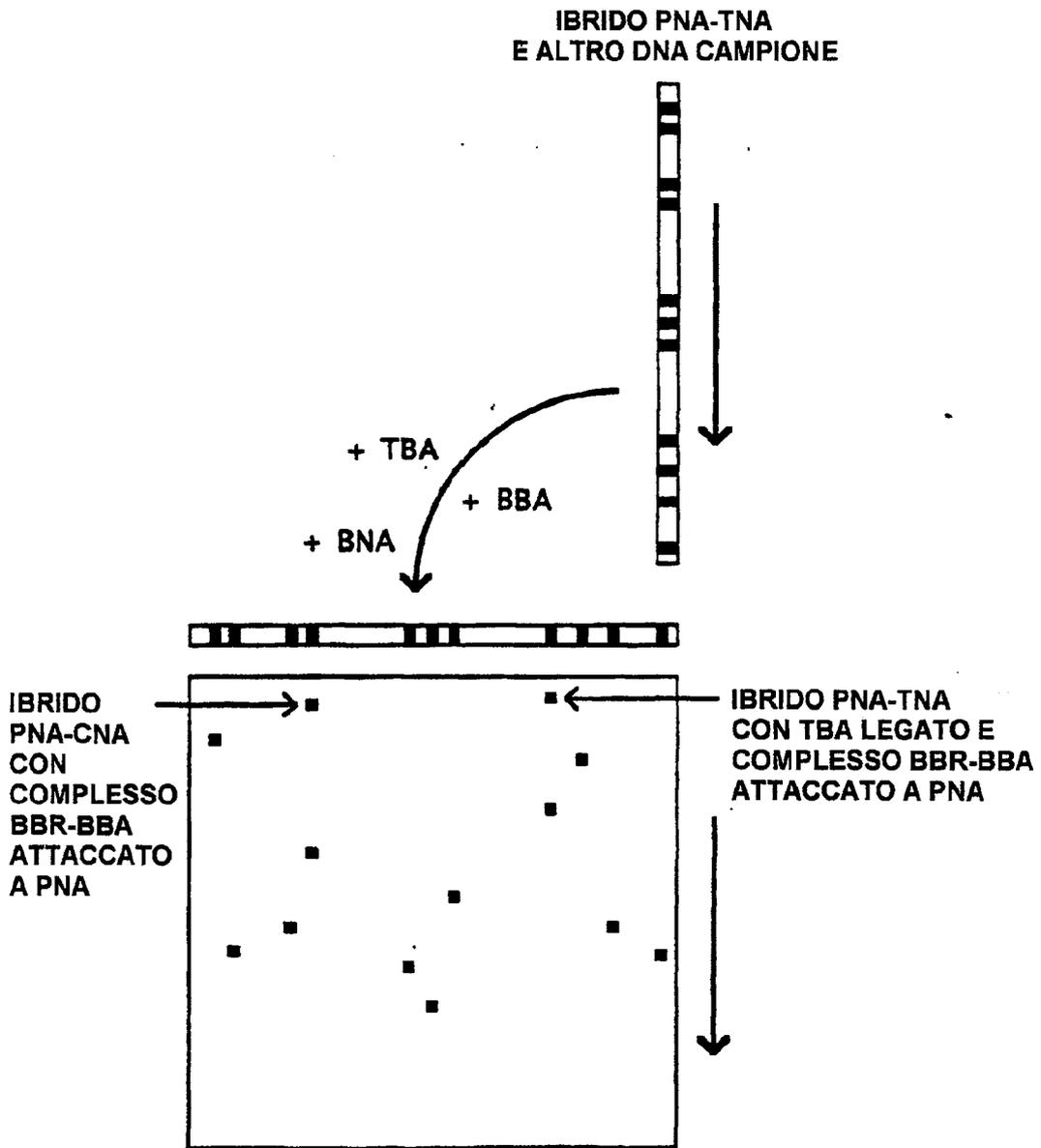


FIGURA 12B

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

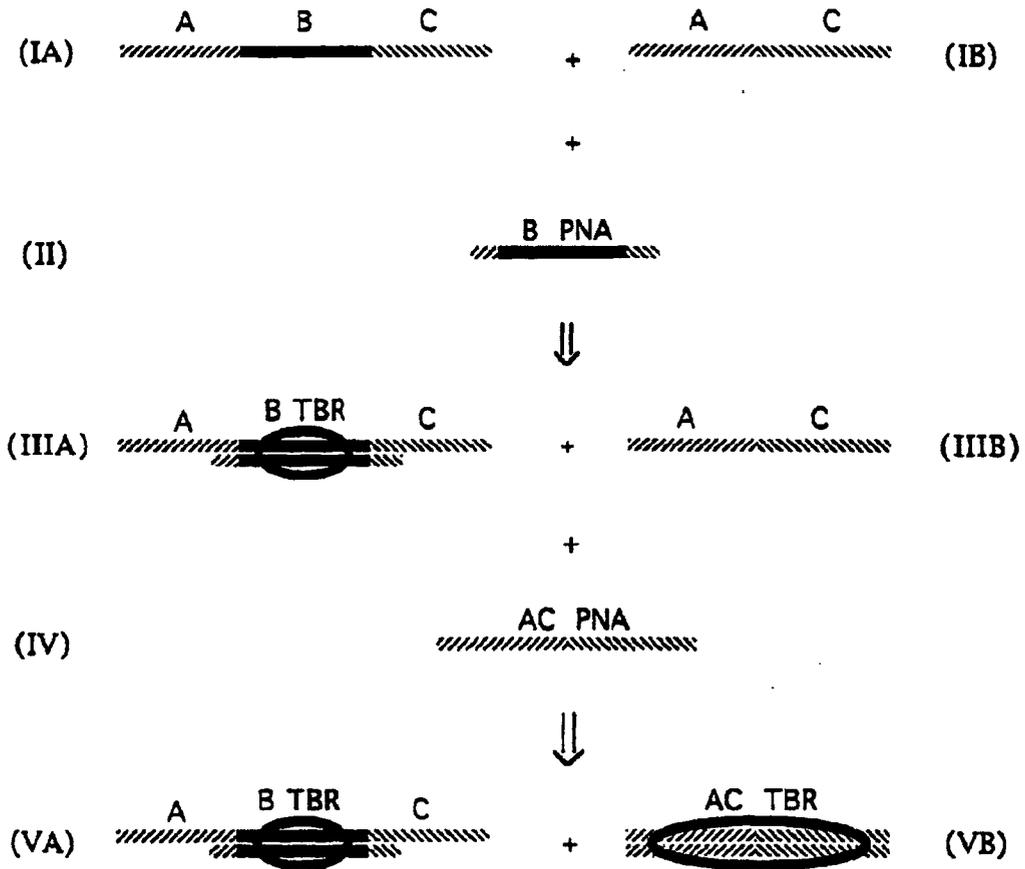


FIGURA 13

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

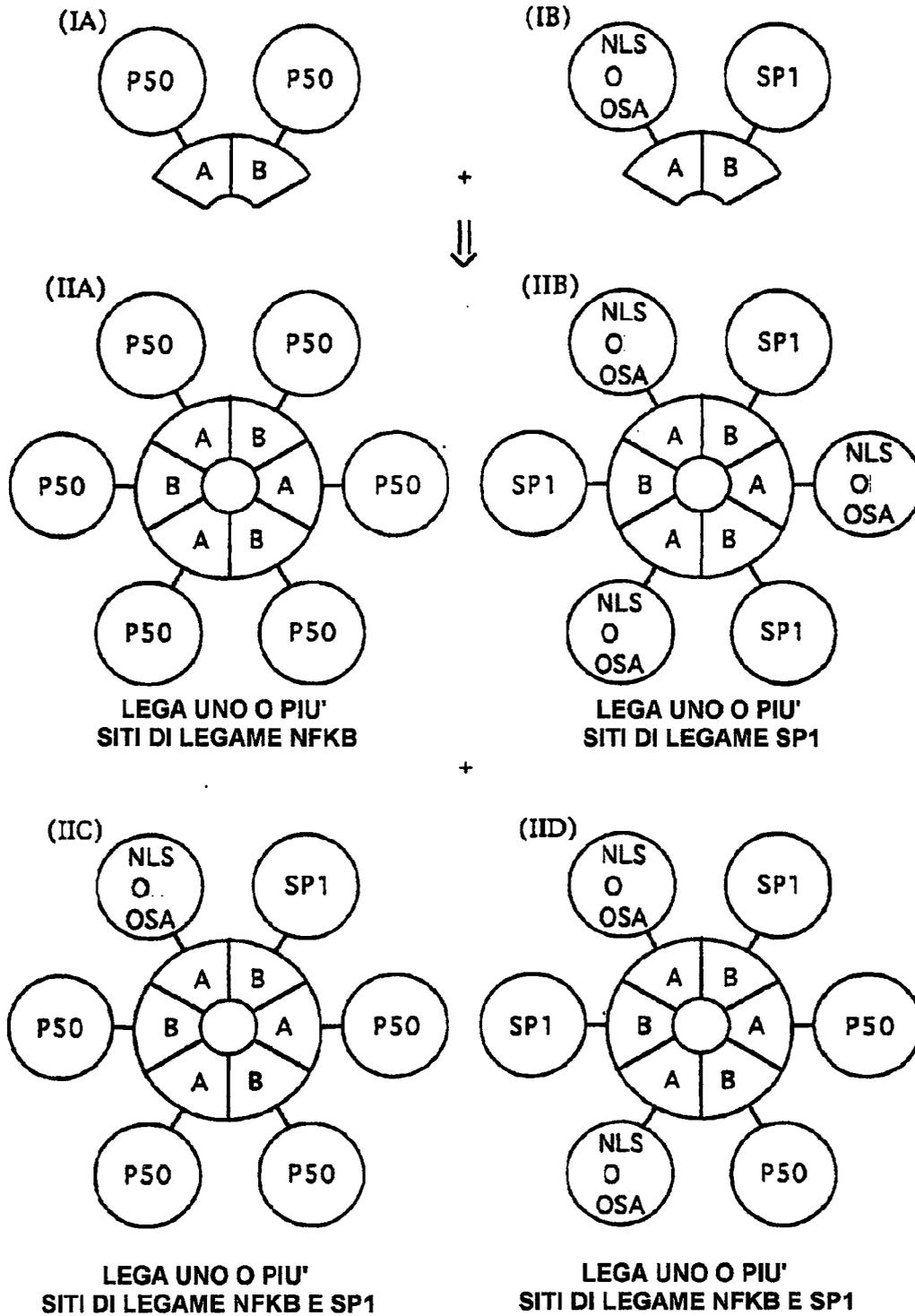


FIGURA 14

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

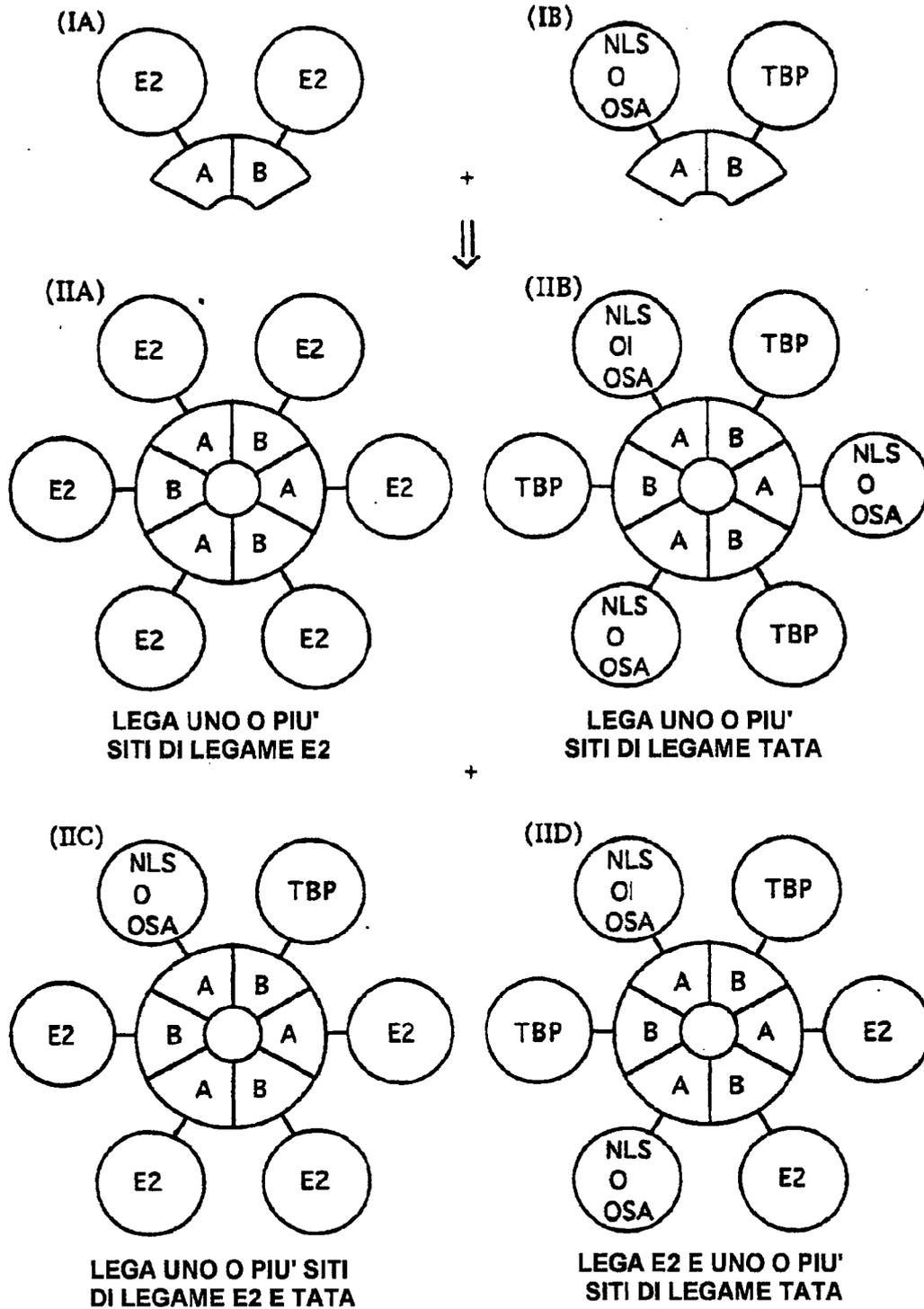


FIGURA 15

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

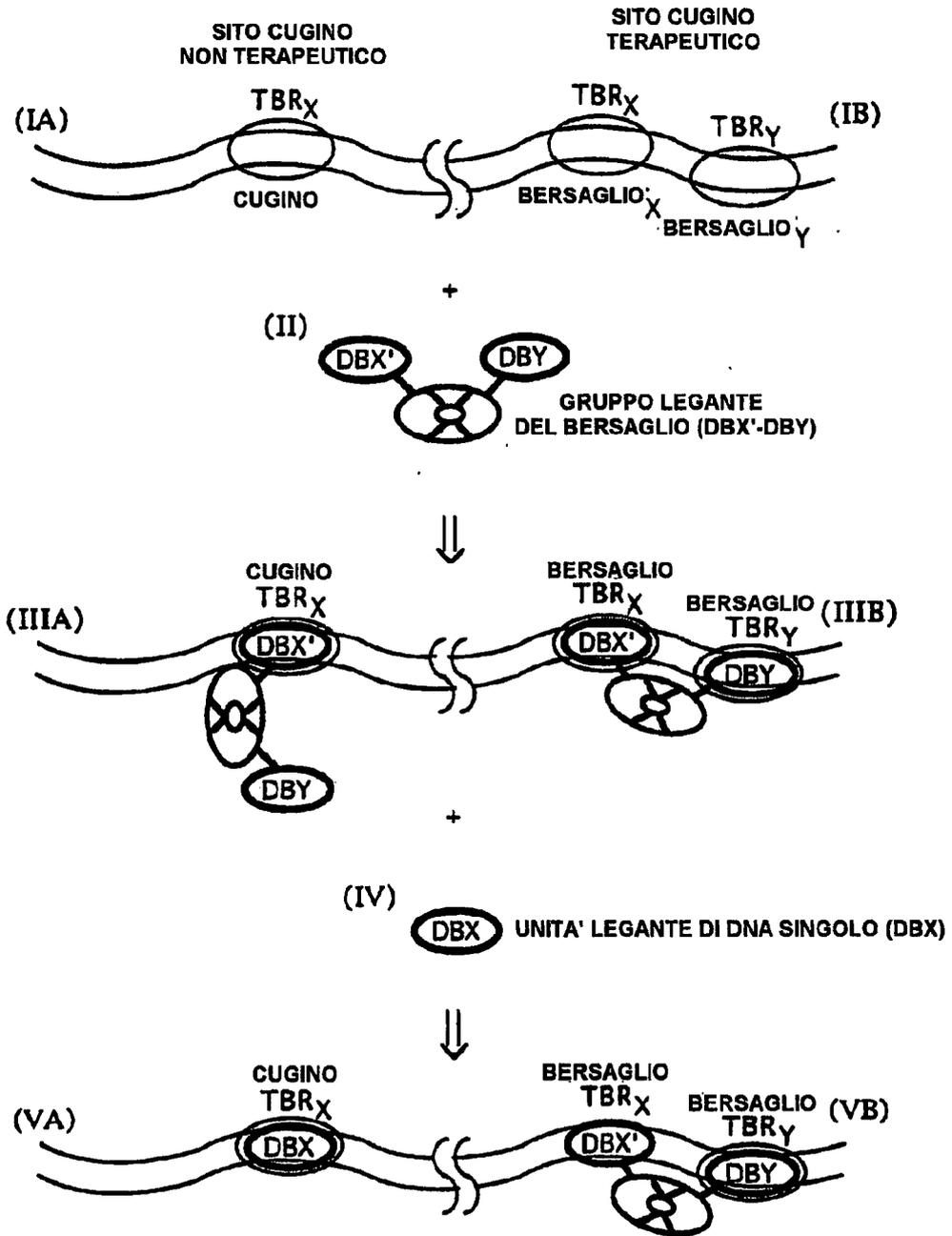


FIGURA 16

p.i.: THE GENE POOL, INC.

Mirko BERGADANO
(Iscrizione Albo nr. 843/B)

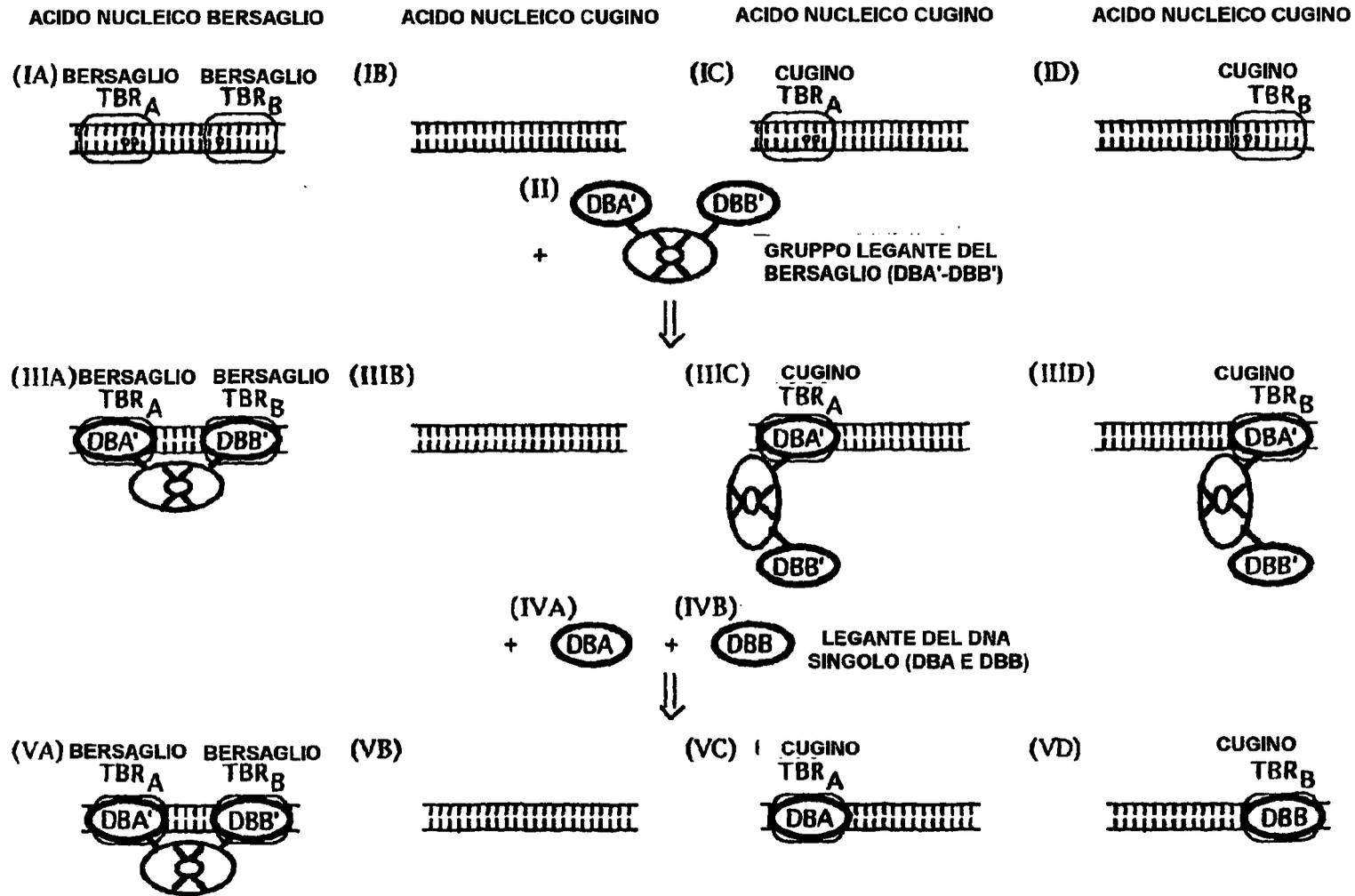


FIGURA 17