

RELAZIONE ANNUALE SUL PROGETTO DI RICERCA:**APPROCCI MOLECOLARI INNOVATIVI NELLA TERAPIA FARMACOLOGICA DELL'EPATITE DA HBV E HCV.**

Produzione di un pannello di anticorpi monoclonali diretti contro la proteina E2 di HCV mediante immortalizzazione di cloni di linfociti B secernenti immunoglobuline specifiche.

Nel corso del I anno di attività di ricerca sono stati utilizzati fondamentalmente due approcci metodologici. Inizialmente sono stati eseguiti numerosi tentativi allo scopo di clonare direttamente linfociti B umani immortalizzati con virus di *Epstein Barr* (EBV). Linee cellulari così ottenute sono state esaminate per la produzione di anticorpi antiglicoproteina-E2 utilizzando una preparazione ricombinante correttamente glicosilata fornita dalla Chiron Corporation. Tale proteina è riconosciuta da oltre il 90% dei sieri di pazienti con infezione cronica da HCV. Per la produzione di linee umane trasformate con EBV sono stati utilizzati pazienti convalescenti da un'epatite acuta C e numerosi pazienti con infezione cronica da HCV. Tale approccio, tuttavia, non ha consentito di isolare con successo linee stabili di cellule B secernenti anticorpi anti-E2 dopo diversi cicli di clonazione, contrariamente ai risultati ottenuti in precedenza per la proteina nucleocapsidica, l'elicasi e la proteina NS4A, un'importante cofattore della proteasi serinica NS3. (Cerino e Mondelli, 1991; Cerino et al., 1993; Mondelli et al., 1994).

Alla luce di questi risultati negativi abbiamo optato per un approccio alternativo. Studi di immunizzazione passiva e di neutralizzazione *in vitro* di isolati di HCV con un siero iperimmune specifico per la regione ipervariabile 1 (HVR1) suggeriscono che gli anticorpi anti-HVR1 potrebbero giocare un ruolo importante nella protezione dall'infezione da HCV. E' noto, tuttavia, che tali anticorpi sembrano coesistere con le varianti virali che riconoscono e risultano frequentemente cross-reattivi nei confronti di sequenze di HVR1 isolate da altri pazienti. Pertanto, il significato della risposta immunitaria umorale nei confronti di HVR1 è in gran parte ancora sconosciuto.

In uno studio recente abbiamo seguito in modo prospettico le risposte sierologiche ad oligopeptidi sintetizzati a partire da sequenze di HVR1 ottenute da pazienti con epatite acuta e cronica da HCV. (Mondelli et al., 1999). E' stata osservata un'ampia cross-reattività sierologica nei confronti di peptidi HVR1 nella maggioranza dei pazienti. La risposta anticorpale risultava ristretta alla sottoclasse IgG1 ed era focalizzata sulla regione carbossiterminale di HVR1. La capacità degli anticorpi a cross-reagire con un ampio pannello di sequenze di HVR1 poteva facilmente essere dimostrata mediante immunizzazione di topi con peptidi derivati da sequenze HVR1 isolate dai nostri pazienti. Inoltre, l'intensità e la cross-reattività delle risposte immunitarie umorali correlava in modo statisticamente significativo con la variabilità a livello della sequenza aminoacidica di HVR1, a sostegno dell'ipotesi che la selezione di varianti virali sia causata dalla pressione immunologica dell'ospite. Del tutto recentemente è stata inoltre descritta una notevole cross-reattività da parte di linfociti T CD4+ ristretti da molecole HLA di classe II specifici per HVR1 (Shirai et al., 1999; Del Porto et al., 2000). Anche in questo caso la risposta CD4 era prevalentemente diretta contro la porzione carbossiterminale di HVR1.

Da quanto sopra esposto risulta chiaro che la selezione di varianti di HCV è in gran parte determinata dalla risposta immunitaria dell'ospite diretta contro la regione HVR1, in cui è concentrato il maggior numero di mutazioni aminoacidiche. Tuttavia, la sequenza di HVR1 si muove in uno spazio evolutivo relativamente ristretto e gli anticorpi circolanti sembrano riconoscere motivi aminoacidici conservati localizzati nella porzione carbossiterminale. Allo scopo di analizzare in dettaglio le basi molecolari dell'ampia cross-reattività anticorpale nei confronti di sequenze di HVR1, abbiamo generato un pannello di anticorpi monoclonali murini ottenuti per immunizzazione con peptidi surrogati di HVR1 (mimotopi), selezionati per affinità con sieri di pazienti con infezione da HCV da una *library* di fagi ricombinanti (Puntoriero et al., 1998). Da un'ampia disamina delle sequenze di HVR1 pubblicate in letteratura abbiamo ottenuto un profilo consensuale rappresentativo di oltre l'80% della variabilità totale delle sequenze. Questo profilo consensuale di HVR1 è stato quindi retrotradotto e gli oligonucleotidi così ottenuti sono stati sequenziati, amplificati e clonati in un vettore fagemidico che è stato utilizzato per trasformare cellule competenti. Le cellule sono state successivamente sovrainfettate con fago *helper*. Le sequenze aminoacidiche così

ottenute sono state ulteriormente selezionate per affinità mediante due cicli di adsorbimento a sieri umani anti-HCV positivi. Sono stati ottenuti circa 200 cloni e da questi, dopo opportuno sequenziamento, sono stati sintetizzati peptidi che hanno costituito il *pool* di mimotopi utilizzati per l'immunizzazione di topi Balb/c. Sono stati adottati due protocolli di immunizzazione. Nel primo protocollo un animale è stato immunizzato con un singolo mimotopo emulsionato in adiuvante di Freund. Dopo *screening* con un mimotopo che si era rilevato come quello più frequentemente riconosciuto da sieri di pazienti con infezione cronica da HCV sono stati ottenuti solo 13 colonie secernenti anticorpi specifici su 544 totali, pari al 2.4%. Tuttavia, solo due ibridomi antigene-specifici entrambi di classe IgM sono stati clonati con successo e stabilizzati. Nel secondo protocollo è stato utilizzato un *pool* di 9 mimotopi sempre emulsionati in adiuvante di Freund. Dopo *screening* con quel mimotopo che aveva già dimostrato caratteristiche di ampia cross-reattività nei confronti di sieri di pazienti, sono state identificate 54 colonie su 165 analizzate (pari al 33%) secernenti anticorpi specifici per HVR1. Da queste linee sono state ottenuti 26 cloni stabili antigene specifici dei quali 4 secernenti IgM, 2 IgA e 20 IgG1. I mAb così ottenuti erano inoltre in grado di riconoscere un ampio numero di peptidi derivati da sequenze naturali di HVR1 isolate da pazienti con infezione acuta e cronica da HCV (Fig. 1). Inoltre, erano in grado di competere efficientemente con sieri di pazienti con infezione cronica da HCV per il legame ai peptidi derivati da sequenze naturali di HVR1, confermando così i nostri risultati ottenuti in precedenza con sieri policlonali di pazienti che avevano dimostrato come i mimotopi di HVR1 fossero a tutti gli effetti rappresentativi di varianti naturali di HVR1 (Fig. 2).

La fine specificità dei mAb murini anti-HVR1 è stata analizzata mediante un pannello di peptidi costituiti da 14 residui aminoacidici scalati di un residuo aminoacidico in modo tale da poter coprire l'intera regione HVR1. Come atteso e in linea con i risultati della mappatura dei sieri di pazienti con infezione da HCV, tutti i mAb analizzati riconoscevano la porzione C-terminale della regione HVR1 e in particolare il sito maggiore di legame agli anticorpi poteva essere mappato in posizione 390-405 della sequenza aminoacidica della poliproteina di HCV. Soltanto un ibridoma ha dimostrato una diversa specificità di legame riconoscendo un epitopo localizzato nella porzione aminoterminale e compreso nei peptidi 384-397 e 385-398 (Fig. 3). Un'ulteriore

importante informazione emersa nel corso della caratterizzazione dei nostri mAb è che alcuni di essi era in grado di riconoscere la sequenza HVR1 non solo sotto forma di peptide lineare, ma anche come proteina chimerica espressa nel contesto dell'intera glicoproteina E2 troncata all'estremità C-terminale (Fig.4). Tale osservazione suggerisce che modificazioni conformazionali non sembrano influire sul riconoscimento anticorpale di questa regione.

I nostri risultati dimostrano che è possibile indurre una risposta anticorpale ampiamente cross-reattiva anche a livello clonale, come suggerito in precedenza (Zhou et al., 1999 e 2000) e che l'efficienza di questo procedimento può essere notevolmente aumentata mediante immunizzazione con un *pool* di peptidi surrogati di HVR1. Tale meccanismo può essere sfruttato con successo per lo sviluppo di un vaccino efficace capace di indurre protezione nei confronti di un vasto repertorio di varianti di HCV.

Prospettive future:

Durante il secondo anno di attività di ricerca ci proponiamo di caratterizzare in dettaglio le proprietà dei mAb specifici per la regione HVR1 di HCV. In particolare, verranno eseguiti esperimenti volti a determinare se i mAb siano in grado di legare particelle di HCV circolanti in sieri di pazienti con infezione cronica da HCV. A questo scopo, microbiglie magnetiche rivestite di mAb di ratto specifiche per Ig di topo verranno incubate con dosi ottimali di mAb anti-HVR1. Dopo lavaggio e verifica che il mAb si sia veramente attaccato alle microbiglie, queste ultime verranno incubate con siero di pazienti ad alto titolo virale per favorire la cattura di HCV. Verrà inoltre verificata la possibile interferenza esercitata da anticorpi anti-HVR1 eventualmente presenti nei sieri. Le particelle di HCV catturate dalle microbiglie potranno essere rivelate mediante determinazione di RNA virale. Come controllo verrà utilizzato un mAb irrilevante. Oltre a particelle naturali, gli esperimenti di cattura verranno condotti anche con particelle non infettive prodotte assemblando proteine strutturali di HCV in cellule di insetto fornite dal Dr. Liang del National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases, NIH, USA (Baumert et al., 1998).

Inoltre, sempre durante il secondo anno di attività, verrà iniziata la produzione di un nuovo pannello di mAb che verrà ottenuto dopo immunizzazione con proteine

chimeriche E2-HVR1. Le proprietà dei mAb ottenuti con il nuovo protocollo di immunizzazione verranno confrontate con quelle dei mAb già ottenuti. In particolare verrà valutata la capacità di inibire il legame della proteina E2 completa della regione HVR1 a CD81 (uno dei recettori utilizzati da HCV per infettare gli epatociti) e ad eventuali altri recettori virali che giocano un ruolo importante nell'internalizzazione di particelle virali negli epatociti e in altre cellule suscettibili.

Bibliografia:

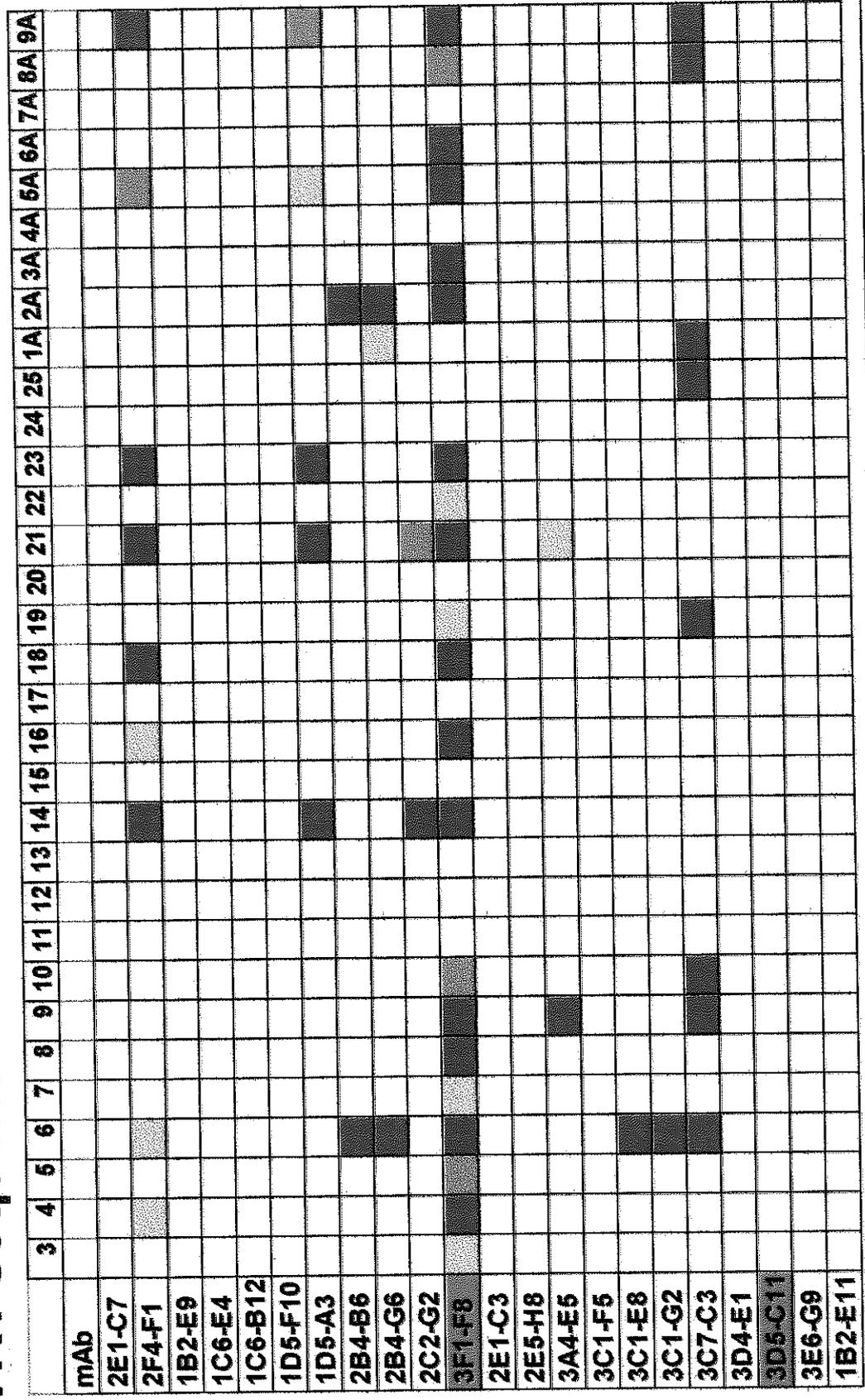
- 1 Baumert TF, Susumu I, Wong DT, Liang TJ. Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol* 1998;72:3827-3836.
- 2 Cerino A, Mondelli MU. Identification of an immunodominant B-cell epitope on the hepatitis C virus non structural region defined by human monoclonal antibodies. *J Immunol* 1991;147:2692-6.
- 3 Cerino A, Boender P, Rosa C, La Monica N, Habets W, Mondelli MU. A human monoclonal antibody specific for the N-terminus of hepatitis C virus nucleocapsid protein. *J Immunol* 1993;151:7005-15.
- 4 Del Porto P, Puntoriero G, Scottà C, Nicosia A, Piccolella E. High prevalence of hypervariable region 1-specific and cross-reactive CD4+ T cells in HCV-infected individuals responsive to IFN- α treatment. *Virology* 2000;269:313-24.
- 5 Mondelli MU, Cerino A, Boender P, Oudshoorn P, Middeldorp J, Fipaldini C, La Monica N, Habets W. Significance of the immune response to a major, conformational B cell epitope on the hepatitis C virus NS3 region defined by a human monoclonal antibody. *J Virol* 1994;68:4829-36.
- 6 Mondelli MU, Cerino A, Lisa A, Brambilla S, Segagni L, Cividini A, Bissolati M, Missale G, Bellati G, Meola A, Bruniercole B, Nicosia A, Galfrè G, Silini E. Antibody responses to hepatitis C virus hypervariable region 1: evidence for cross-reactivity and immune-mediated sequence variation. *Hepatology* 1999;30:537-45.
- 7 Puntoriero G, Meola A, Lahm A, Zucchelli S, Bruno B, Tafi R, Pezzanera M, Mondelli MU, Cortese R, Tramontano A, Galfrè G, Nicosia A. Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: mimotopes of the hypervariable region 1 can

- induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants. *EMBO J* 1998;17:3521-33.
- 8 Shirai M, Arichi T, Chen M, Nishioka M, Ikeda, K, Takahashi H, Enomoto N, Saito T, Major ME, Nakazawa T, Akatsuka T, Feinstone SM, Berzofsky JA. T cell recognition of hypervariable region-1 from hepatitis C virus envelope protein with multiple class II MHC molecules in mice and humans: preferential help for induction of antibodies to the hypervariable region. *J Immunol* 1999;162:568-76.
 - 9 Zhou Y-H, Moriyama M, Esumi M. Multiple sequence-reactive antibodies induced by a single peptide immunization with hypervariable region 1 of hepatitis C virus. *Virology* 1999;256: 360-70.
 - 10 Zhou Y-H, Shimizu YK, Esumi M. Monoclonal antibodies to the hypervariable region 1 of hepatitis C virus capture virus and inhibit virus adsorption to the susceptible cells *in vitro*. *Virology* 2000;269:276-283.

Legenda:

- Fig. 1** Reattività di alcuni mAb rappresentativi del nostro pannello nei confronti di peptidi lineari di 16 residui aminoacidici sintetizzati sulla base di sequenze di isolati naturali di HVR1 ottenuti da pazienti con epatite acuta e cronica. I diversi colori indicano l'intensità della reazione. I mAb sono indicati nella colonna di sinistra, mentre le sigle dei peptidi sono collocate in alto.
- Fig. 2** Inibizione competitiva del legame di un mAb rappresentativo a peptidi di isolati naturali di HVR1 da parte di sieri di pazienti con infezione cronica da HCV.
- Fig. 3** Fine specificità di mAb anti-HVR1, ottenuta mediante mappatura con peptidi di 14 aminoacidi scalati da un singolo residuo. La maggior parte dei mAb riconosce la porzione carbossiterminale di HVR1, mentre uno solo riconosce la porzione aminoterminale.
- Fig. 4** Reattività di alcuni mAb (elencati in alto all'apice delle colonne) nei confronti di sequenze HVR1 espresse sia come peptidi lineari (indicati con numeri) sia come proteine chimeriche (indicate con E2 seguito da un numero) o derivate da isolati naturali (H661, BK661, N2, 2a). I diversi colori indicano l'intensità della densità ottica in un test ELISA. La sequenza definita dal peptide lineare 539 e dalla proteina E2-F78 appare come la più frequentemente riconosciuta. Il mAb 3C7-C3 esprime una cross-reattività particolarmente ampia nei confronti di varie sequenze.

Murine mAb reactivity with 16-mers derived from natural HVR1 sequences



A₄₉₂: 0-0.5 0.5-1.5 1.5-2.5 > 2.5

IgG1 IgA

Fine mapping of HVR1-specific mAb

	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397
	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410
mAb														
2E1-C3														
2E1-C7														
2F4-F1														
1B2-E9														
1C6-E4														
1C6-B12														
1D5-F10														
1D5-A3														
2B4-B6														
2B4-G6														
2C2-G2														
3F1-F8														
2E6-H8														
3A4-E5														
3C1-F5														
3C1-E8														
3C1-G2														
3C7-C3														
3D4-E1														
3D5-C11														
3E6-G9														

A₄₉₂: 0-0.5 0.5-1.5 1.5-2.5 > 2.5

IgG1 IgA

MAb binding to HVR1 linear peptides and E2-HVR1 chimaeric proteins

	2F4-F1	1B2-E9	1C6-E4	1D5-F10	1D5-A3	2B4-B6	2B4-G6	2C2-G2	3C1-F5	3C7-C3	3D5-C11
WT											
267	■					■					
E2-267	■					■				■	
268										■	
E2-268										■	
269				■							
E2-269				■						■	
107											
E2-275						■				■	
730						■				■	
E2-304						■				■	
H661										■	
735										■	
E2-21										■	
732										■	
E2-103										■	
731										■	
E2-163										■	
509	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
E2-F78	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
135											
BK661						■				■	
137										■	
N2											
2a											

A₄₉₂: 0-0.5 □ 0.5-1.5 □ 1.5-2.5 □ > 2.5 ■

IgG1 □ IgA ■

■ selecting mimotope

Sviluppo di un sistema di PCR quantitativa per la determinazione della carica virale di virus dell'epatite B (HBV) e l'evidenziazione di ceppi resistenti al trattamento con lamivudina (3TC).

E' stato sviluppato un sistema di PCR che permette l'identificazione rapida di varianti virali con sostituzioni nella catena aminoacidica della DNA polimerasi associate a resistenza a 3TC. Inoltre, questo sistema rapido e di semplice esecuzione è stato comparato con un'altra metodica PCR originale per determinare quale dei due sistemi diagnostici fornisse le maggiori potenzialità applicative in campo diagnostico. Nel dettaglio, le due metodiche permettono l'identificazione delle sostituzioni Leu₅₂₈=>Met e Met₅₅₂=>Ile/Val ma presentano un disegno profondamente differente:

- i) ***restriction fragment length polymorphism, (RFLP), assay.*** La prima metodica si basava sull'amplificazione di due regioni del gene POL di HBV mediante PCR e utilizzo di *primers* modificati seguita da analisi di restrizione del prodotto di amplificazione. Per l'analisi del codone in posizione 528, sono stati sviluppati due *primers* specifici (F3, B2) di cui quello in posizione *upstream* (F3) è stato modificato in modo da inserire nel prodotto di amplificazione un sito di restrizione per l'endonucleasi NlaIII quando è presente la sostituzione nucleotidica TTG (Leu)=> ATG (Met) (Figura 1).
Per l'analisi del codone in posizione 552, è stato sviluppato un *primer upstream* specifico (F1) in grado di inserire artificialmente un sito di restrizione per l'endonucleasi NdeI nel prodotto di amplificazione ottenuto con la coppia di primers F1, B2 quando in presenza di una sequenza genica non mutata (ATG, Met). Le sostituzioni nucleotidiche ATG=> GTG (Val) o ATT (Ile) sopprimendo il sito di restrizione determinavano l'impossibilità di clivaggio del prodotto di amplificazione F1-B2 da parte di NdeI. Infine, mediante restrizione con NlaIII dello stesso prodotto di amplificazione era possibile differenziare le varianti virali con mutazione Met=>Ile (assenza di restrizione) da quelle con mutazione Met=>Val (presenza di restrizione) (Figura 2).

- ii) **5'=>3' nuclease assay.** La seconda metodica si basava sull'attività 5'=>3' esonucleasica dell'enzima Taq polimerasi utilizzato nella reazione di PCR per degradare una sonda costruita in modo da avere all'estremo 5' una molecola fluorescente mentre all'estremo 3' una molecola con funzione di soppressore della emissione fluorescente (*quencher*). La degradazione della sonda, con conseguente emissione di fluorescenza, da parte della Taq polimerasi può avvenire solo se la sonda è ibridata con una catena di DNA complementare. Pertanto, sono state disegnate sonde specifiche per la sequenza non mutata (*wild type*) e per la sequenza mutata, ciascuna legata ad un diverso fluorocromo. L'emissione di fluorescenza specifica ottenuta durante la fase di amplificazione del DNA di HBV era pertanto associata alla presenza delle diverse varianti virali.

Entrambe le metodiche sono state validate analizzando in parallelo 50 campioni di siero da pazienti in terapia con 3TC. Inoltre, i risultati ottenuti mediante *RFLP assay* e *5'=>3' nuclease assay* sono stati confrontati con quelli ottenuti mediante sequenziamento diretto del gene POL di HBV (metodica di riferimento). L'elenco e le sequenze nucleotidiche dei primers utilizzati in *RFLP assay* e *5'=>3' nuclease assay* e sequenziamento sono riportati nella Tabella 1

Inoltre, la potenzialità di identificazione da parte delle due nuove metodiche di mutanti resistenti a 3TC presenti nell'ambito di popolazioni virali miste è stata verificata testando miscele di DNA di HBV da ceppi sensibili e resistenti clonato in vettori plasmidi.

La comparazione tra le tre metodiche ha fornito i seguenti risultati:

- i) l'analisi del codone 528 mediante *RFLP assay* ha fornito gli stessi risultati rispetto a sequenziamento in 38/50 (76%) campioni, mentre in 7/50 (14%) *RFLP assay* è risultato più sensibile nell'identificazione di ceppi mutati. Analogamente, l'analisi del codone 552 mediante *RFLP assay* ha fornito gli stessi risultati in 36/50 (72%) campioni, mentre in 10/50 (20%) *RFLP assay* è risultato più sensibile nell'identificazione di ceppi mutati.

- ii) Dall'analisi comparativa di 40 pazienti mediante *RFLP assay* e *5'=>3' nuclease assay* si è dimostrato che, per quanto riguarda il codone 528, in 18/40 (45%), campioni sono stati ottenuti gli stessi risultati, mentre per quanto riguarda il codone 552, concordanza di risultati è stata documentata in 23/40 (57.5%) campioni. In 8/40 (20%) campioni *RFLP assay* è risultato più sensibile di *5'=>3' nuclease assay* e in 7/40 (17.5%) campioni *5'=>3' nuclease assay* è risultato più sensibile di *RFLP assay*.
- iii) Miscelando DNA di HBV da ceppi resistenti e sensibili clonato in vettori plasmidici, si è potuto definire che *RFLP assay* era in grado di evidenziare sequenze virali mutate presenti in proporzioni diverse a seconda del numero di copie input (Tabella 2). Tuttavia, solo in circa il 10% dei campioni con ≤ 1.000 copie di HBV DNA mutazioni in posizione 528 o 552 potevano essere identificate.
- iv) *RFLP assay* si è dimostrato superiore alla metodica di sequenziamento e *5'=>3' nuclease assay* nella quantificazione di ceppi mutanti in popolazioni virali miste.

I risultati qui sopra riportati sono stati oggetto di pubblicazione (Allen et al., J. Clin. Microbiol. 37: 3338-3347, 1999).

Prospettive future:

Dal momento che *RFLP assay* si è dimostrata essere una metodica con prestazioni superiori in termini di sensibilità di identificazione di sequenze mutate e di quantificazione del rapporto tra ceppi resistenti e sensibili in popolazioni virali miste, sarebbe utile che la metodica di PCR alla base di questo saggio molecolare venisse elaborata in senso quantitativo in modo da ottenere una miglior definizione della cinetica di emergenza dei ceppi di HBV farmaco-resistenti in corso di terapia. Pertanto verranno costruite due molecole di DNA ricombinante: una sarà costituita dalla regione del gene POL di HBV amplificata con il set di primers F1-B2 e clonata in un vettore plasmidico (standard quantitativo) e l'altra sarà costituita da una molecola ricombinante formata da una sequenza di DNA eterologo (di origine plasmidica) cui verranno artificialmente aggiunte le sequenze di DNA target per la coppia di primers F1 e B2

secondo un protocollo da noi sviluppato (Zipeto et al., 1993). Anche questa molecola di DNA ricombinante una volta clonata in un vettore plasmidico risulterà amplificabile dalla stessa coppia di primers utilizzata per l'identificazione di ceppi di HBV ma sarà differenziabile dal prodotto di amplificazione del gene POL di HBV per una diversa dimensione (controllo interno). La reazione di quantificazione mediante PCR seguirà un protocollo da noi sviluppato per altri virus a DNA (Gerna et al, 1994, Revello et al., 1997, Baldanti et al., 2000) che prevede l'amplificazione in parallelo dei campioni clinici e di quantità scalari dello standard quantitativo in presenza di una quantità fissa di controllo interno.

Bibliografia:

1. Baldanti F, Grossi P, Furione M, Simoncini L, Sarasini A, Comoli P, Maccario R, Fiocchi R, Gerna G. High levels of Epstein-Barr virus DNA in blood of solid organ transplant recipient and their value in predicting post-transfusional lymphoproliferative disorders. *J Clin Microb* 2000;38:613-619.
2. Gerna G, Baldanti F, Sarasini A, Furione M, Percivalle E, Revello MG, Zipeto D, Zella D. Effect of foscarnet induction treatment on quantitation of human cytomegalovirus (HCMV) DNA in peripheral blood polymorphonuclear leukocytes and aqueous humor of AIDS patients with HCMV retinitis. The Italian Foscarnet Study Group. *Antimicrob Agents Chemother* 1994 38: 38-44.
3. Revello MG, Baldanti F, Sarasini A, Zella D, Zavattoni M, Gerna G. Quantification of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with herpes simplex encephalitis by the polymerase chain reaction. *Clin Diagn Virol* 1997;7:183-91.
4. Zipeto D, Baldanti F, Zella D, Furione M, Cavicchini A, Milanesi G, Gerna G. Quantification of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood polymorphonuclear leukocytes of immunocompromised patients by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1993;44:45-55.

TABLE 1. DNA sequence of all primers and probes used for HBV DNA analyses

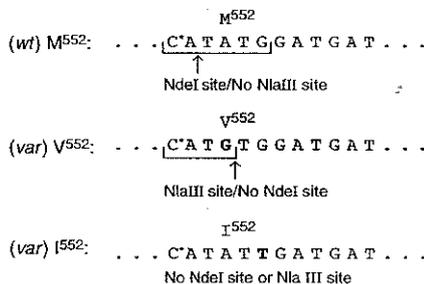
Primers and probes	DNA sequence
Primers used for conventional DNA sequencing	
377.....	5'-GGATGTGTCTGCGGCGTTF-3'
840.....	5'-ACCCCATCTTTTGTITTTGTTAGG-3'
12F.....	5'-AGACTCGTGGTGGACTTCTCT-3'
5RC.....	5'-CAAAGAAAATTGGTAACAGCGGTA-3'
Primers used for RFLP analysis	
F1.....	5'-CACTGTTTGGCTTTCAGTCAT-3'
F3.....	5'-GTGGGCCTCAGTCCGTTTCTC-3'
B2.....	5'-GTTCAAATGTATACCCAAAG-3'
Primers used for amplification for the 5'-nuclease assay for:	
Codon 528	
HBVG.F464.....	5'-TGTTGCCCGTTTGTCTC-3'
HBVG.R711.....	5'-AGCCAAACAGTGGGGGAA-3'
Codon 552	
HBVG.F696A.....	5'-TCAGTGGTTCGTAGGGCTTT-3'
HBVG.R840A.....	5'-CCATCTCTTTGTTTTGTTAGG-3'
Fluorescent probes used for 5'-nuclease assay for:	
Codon 528	
Set I	
528wt.....	5'-FAM-CCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGT-TAMRA 3'
528mut.....	5'-TET-CCCGTTTCTC AT GGCTCAGTTTACTAGT-TAMRA 3'
Set II	
528wt.....	5'-FAM- TCCGTTTCTC ITGGCTCAGTTTACTAGTGC-TAMRA 3'
528mut.....	5'-TET- TCCGTTTCTC AT GGCTCAGTTTACTAGTGC-TAMRA 3'
Codon 552	
Set I	
552wt.....	5'-FAM-TGGCTTTCAG TTATAT GGATGATGTGG-TAMRA 3'
552mut1.....	5'-TET-TGGCTTTCAG TTAT GTGGATGATGTG-TAMRA 3'
552mut2.....	5'-HEX-TTGGCTTTCAG TTATAT IGATGATGTGG-TAMRA 3'
Set II	
552wt.....	5'-FAM-TGGCTTTCAGCTAT AT GGATGATGTG-TAMRA 3'
552mut1.....	5'-TET-TGGCTTTCAGCTAT GT GGATGATGT-TAMRA 3'
552mut2.....	5'-HEX-TGGCTTTCAGCTAT AT IGATGATGTGG-TAMRA 3'

^a Boldface and italics indicate sites of heterogeneity due to subtype differences; boldface and underlining indicate sites of sequence variations in HBV species associated with in vitro lamivudine resistance.

A.

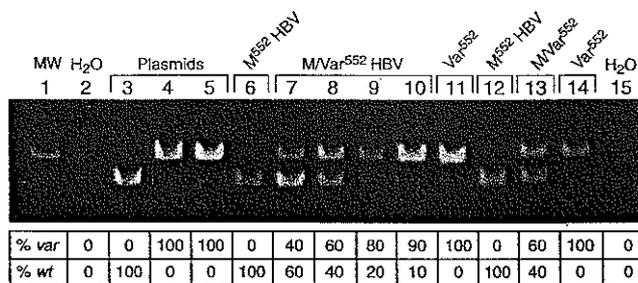
A → G base change at nt 741 (M⁵⁵² → V⁵⁵²) / G → T base change at nt 743 (M⁵⁵² → I⁵⁵²) (F1B1 - 119 bp PCR fragment)

Pol aa seq 545- H C L A F S Y M D D . . . L G I H L N - 5 8 4 . .
 Pol nt seq 720- C A C T G T T T G G C T T T C A G T T A T A T G G A T G A T . . . C T T T G G G T A T A C A T T T G A A C - 8 3 9 . .
 F1 Primer Binds Complementary Seq of B2 Primer



B.

Nde I analysis of site 552 (Nde I cuts M⁵⁵² template only)



C.

Nla III analysis of site 552 (Nla III cuts V⁵⁵² template only)

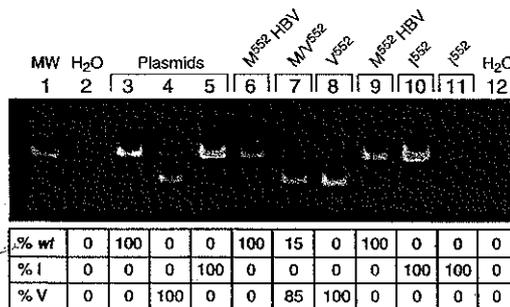


FIG. 2. Design and gel image of an RFLP assay for rapid detection of HBV variant at codon 552. (A) For detecting variations at codon 552 in the HBV polymerase, the YMDD nucleotide sequence TATATGGATGAT was used, and a 5'-PCR primer (primer F1) was designed that contains a CAT sequence at the 3' end (changing the first tyrosine codon from a TAT to a CAT) in order to introduce an *NdeI* restriction site (CA ↓ TATG) upon amplification of part of the HBV polymerase gene with the 5'-PCR primer and a 3'-PCR primer located 120 bases downstream. The creation of an *NdeI* site occurs only if the template HBV has the wt DNA sequence and is absent if the template HBV is mutated, indicating the loss of the *NdeI* site only. (B) Result of sample analysis at codon 552 after *NdeI* enzyme digestion. Resolution of PCR products on a polyacrylamide gel after amplification of template HBV DNA using primers F1 and B2 with subsequent digestion using *NdeI* indicates either wt sequence (faster moving band) or variant sequence (slower moving band). Lane 1, molecular weight markers; lane 2, water (negative control); lane 3, wt pCMVHBV plasmid; lane 4, LS28M/M552V pCMVHBV plasmid; lane 5, M552I pCMVHBV plasmid; lanes 6 to 11, HBV DNA from sera of different patients undergoing lamivudine therapy that are either wt at codon 552, M552V, or both; lanes 12 to 14, HBV DNA from sera of different patients on lamivudine therapy that are wt at codon 552, M552I, or both; lane 15, water. The amount of each DNA present in lanes (expressed as a percentage) is shown below the image and was quantitated as described in Materials and Methods. var, variant. (C) After determining the sequence (wt or variant) of a sample from results of the *NdeI* analysis shown in Fig. 2B, the sequence of the variant template (Val or Ile) can be determined by *NlaIII* enzyme digestion of the PCR products. Resolution of the PCR products on a polyacrylamide gel after amplification of template HBV DNA using primers F1 and B2 with subsequent digestion using *NlaIII* indicates either a valine sequence (faster moving band) or methionine or isoleucine sequence (slower moving band) at codon 552. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, water (negative control); lane 3, wt pCMVHBV plasmid; lane 4, LS28M/M552V pCMVHBV plasmid; lane 5, M552I pCMVHBV plasmid; lanes 6 to 8, HBV DNA from sera of different patients undergoing lamivudine therapy that are either wt at codon 552, M552V, or both; lanes 9 to 11, HBV DNA from sera of different patients undergoing lamivudine therapy that are wt at codon 552, M552I, or both; lane 15, water. The amount of each DNA present in lanes (expressed as a percentage) is shown below the image and was quantitated as described in Materials and Methods.

TABLE 2. Lower limit of HBV DNA concentrations for the detection of mixed populations of wt and M552V sequences by RFLP assay

Ratio {wt(M552): variant(V552)}	Total HBV DNA in log ₁₀ units (approx copies/ml)
100:0	<2.80 (<625)
10:90	3.67 (5,000)
25:75	3.29 (2,000)
50:50	2.83 (700)
75:25	3.54 (3,500)
90:10	3.49 (3,100)
0:100	<2.80 (<625)

Manoscritti pubblicati o in stampa a tutt'oggi con il contributo della Fondazione Oretta Bartolomei Corsi:

- Cerino A., Meola A., Segagni L., Bruniercole B., Galfrè G., Nicosia A., Mondelli MU. Characterization of monoclonal antibodies (mAb) from mice immunized with HCV hypervariable region 1 (HVR1) mimotopes. *Hepatology*;1999;30:450A
- Allen M.I., Gauthier J., DesLauriers M., Bourne E.J., Carrick K.M., Baldanti F., Ross L.L., Lutz W.L., Condey L.D. Two sensitive PCR-based methods for detection of hepatitis B virus variants associated with reduced susceptibility to lamivudine. *J Clin Microb* 1999;37:3338-3347.
- Mondelli M.U., Cerino A., Segagni L., Meola A., Cividini A., Silini E., Nicosia A. Hypervariable region 1 (HVR1) of HCV: immunological decoy or biologically relevant domain? *Antiviral Res* 2000, *in press*.