

Tecniche di proteomica microestrattiva per la caratterizzazione chimica di proteine nella forma nativa a scopo diagnostico



Descrizione dell'invenzione

Una tecnica standardizzata di micro-estrazione proteica altamente efficiente applicabile in più campi, ed in particolare, nella diagnostica umana. Il protocollo brevettato consente di estrarre ed identificare le proteine, senza alterarle, partendo da piccole quantità di materiale biologico. La tecnica funziona indipendentemente dall'origine del materiale biologico e dal metodo di sua conservazione, non utilizza metodi fisici o chimici destruenti o l'uso di alte temperature. Partendo da soli 2-3 mg di tessuto, la tecnica consente di a) ottenere proteine native da tessuti inclusi in paraffina (aprendo la possibilità allo studio mutazioni post-traduzionali), b) studiare mutazioni post-traduzionali (es. il folding, le interazioni molecolari, glicosilazione, idrossilazione, fosforilazione, proteolisi, le modificazioni lipidiche) e c) studiare le interazioni proteina-proteina nel tessuto. La prima applicazione nella diagnostica messa a punto ed oggi in fase di validazione avanzata, è nella diagnosi della amiloidosi. L'utilizzo della tecnica brevettata consente l'estrazione delle fibrille di amiloide depositate negli organi in modo efficace, utilizzando minore quantitativo di materiale biologico rispetto alle tecniche esistenti.

A che bisogno risponde

Un'accurata diagnosi e tipizzazione dell'amiloidosi sono fondamentali per determinare la prognosi ed il trattamento farmacologico. La diagnosi di amiloidosi è strutturata in due steps successivi: 1- riscontro istologico della presenza di fibrille di amiloide e 2- tipizzazione chimica delle proteine che compongono i depositi. Tradizionalmente, l'isolamento delle fibrille di amiloide richiede protocolli complicati, che necessitano di elevate quantità di materiale di partenza. La nostra tecnica micro-estrattiva è in grado di ottenere un estratto proteico pronto per l'analisi chimica, senza cambio di buffer, partendo da diversi tipi di materiale e da quantità minime di tessuto come le biopsie. È inoltre in grado di ottenere un buon

estratto proteico anche partendo da materiali mantenuti in diversi buffer di conservazione. Questa tipologia di estrazione aiuta a risolvere due problematiche: 1) permette di estrarre da materiale di recupero non conservato per l'estrazione proteica in sé, e 2) il materiale può essere trasportato senza la necessità di trasporto a temperatura controllata (+4°C o -20°C) che risulta essere costoso in caso di grandi distanze da coprire. Questo tipo di estrazione, svincolandosi dal tessuto, è in grado di superare tutti i *bias* di tipo tecnico di cross-reazione anticorpale o non reazione anticorpale dopo immunostochimica dovuti magari a mutazioni dei siti antigenici. Avere l'estratto proteico in sé permette di superare l'ostacolo della terza dimensione cioè della struttura tridimensionale dei tessuti.

Esigenze del mercato/dimensioni del mercato e applicazioni

Si stima che ci siano in Italia circa 800 nuovi casi di amiloidosi ogni anno. Si ritiene che la rarità dei casi segnalati possa essere dovuta, almeno in parte, ad un ritardo diagnostico (e talvolta ad una mancata diagnosi) di mesi, od addirittura di anni, per la scarsità dei sintomi all'esordio e per la lentezza e delle manifestazioni di danno negli organi. Solo nel nostro centro arrivano ogni anno in media dai 60 agli 80 casi nuovi ogni anno. Nel campo delle analisi diagnostiche viene sempre più richiesto un approccio standardizzato e che possibilmente superi *bias* che possono inficiare il risultato finale. Si richiedono, inoltre, un'analisi il più possibile precisa in un tempo sempre più ridotto utilizzando anche materiale limitato. Ci si aspetta che la tecnica oggetto dell'invenzione risponda a queste esigenze. Altre applicazioni possibili sono tutte quelle in cui si voglia identificare la natura chimica dei componenti di un tessuto, inclusi tutti i campi di diagnostici e di ricerca dove si voglia caratterizzare la componente proteica di un tessuto, senza alterare la forma nativa delle proteine.

Commercializzazione/stato di avanzamento

Attualmente tutti i componenti dell'invenzione ed il metodo sono in fase di convalidazione. I risultati nella diagnosi della amiloidosi vengono costantemente comparati con i risultati ottenuti dalla microscopia elettronica che è ancora ritenuta essere il "gold standard" diagnostico.

Titolarità del brevetto: Università di Padova

Inventore Proponente: Dott.ssa Chiara Castellani - Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari

Status del brevetto: Domanda Italiana 102016000016737 depositata il 18/02/2016

Disponibilità alla licenza: Italia