

**TRADUZIONE**

**Brevetto Europeo n° EP 3 575 792**

Domanda di Brevetto Europeo n°19169482.7

Depositata in data 31 maggio 2012

5 Titolo: **“METODO DI VALUTAZIONE DEL RISCHIO DI PML”**

Titolare: **Biogen MA Inc.**, con sede in 225 Binney Street, Cambridge, MA 02142 / STATI  
UNITI

\*\*\*

**DESCRIZIONE**

10 **CAMPO DELL'INVENZIONE**

L'invenzione si riferisce a metodi per valutare il rischio di un paziente di sviluppare la leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML).

**SFONDO DELL'INVENZIONE**

Il terapeutico a base di anticorpo anti-VLA-4 (very late antigen 4) natalizumab è  
15 indicato per trattare le forme recidivanti di sclerosi multipla (SM) e malattia di Crohn da moderata a grave. Il trattamento con natalizumab, tuttavia, è associato a un rischio aumentato di leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML), un'infezione cerebrale opportunistica causata dal virus JC (JCV). La PML si verifica principalmente in individui immunocompromessi e in pazienti in cura con determinate terapie immunomodulatorie, incluso  
20 natalizumab. Si ipotizza che la PML sia il risultato di una complessa interazione tra ospite e fattori virali, portando a riattivazione e alla mutazione dell'archetipo latente JCV in una forma neurotrofica che può infettare gli oligodendrociti nel sistema nervoso centrale.

Sandrock et al, 2011. Neurology, 76 (9, suppl 4), A248) si riferisce alla stratificazione del rischio di PML in pazienti con SM e al ruolo dell'uso precedente di immunosoppressori,  
25 durata del trattamento con natalizumab e stato anticorpale anti-JCV. Gorelik et al, 2010. Ann

Neurol, 68(3), 295-303 si riferisce agli anticorpi anti-JCV e alle implicazioni della stratificazione del rischio di PML. Subramanyam et al, 2011. Neurology, 76(9, suppl 4), A636-A637 si riferisce al rilevamento di anticorpi anti-JCV prima di e dopo la diagnosi di PML in pazienti con SM trattati con natalizumab. Warnke et al, 2010. March Neurol, (6788), 923-930 si riferisce ai fattori causali di natalizumab e PML. Wright et al, 1993, Rev. Tech; 12(2):435-50 si riferisce alla standardizzazione e convalida di tecniche di saggio immunoassorbente enzimale legate per il rilevamento di anticorpi nella diagnosi della patologia infettiva. WO 2011/085369 A1 si riferisce a metodi e reagenti per analizzare un campione in presenza di anticorpi del virus JC, come un metodo che include ottenere un campione biologico da un soggetto, mettere a contatto il campione con particelle simil-virali altamente purificate (HPVLP) in condizioni adatte al legame di un anticorpo JCV nel campione con un HPVLP, e rilevare il livello di legame dell'anticorpo JCV nel campione con HPVLP. La patogenesi dell'infezione di JCV viene descritta, ad esempio, nel libro "Polyomaviruses and Human Diseases", edito da Nasimul Ahsan, ISBN: 0-387-29233-0, capitolo 19, pagine 266-273.

## 15 **RIASSUNTO DELL'INVENZIONE**

L'invenzione si riferisce a un dosaggio sensibile, analiticamente validato ottimizzato per rilevare la presenza di anticorpi contro JCV in siero o plasma.

Di conseguenza, l'invenzione offre un metodo per valutare il rischio del paziente di sviluppare la leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML), il metodo comprendendo:

20 (i) determinare, in un campione di siero o plasma del paziente, un titolo di anticorpo anti-virus JCV, in cui il titolo dell'anticorpo anti-JCV viene determinato mediante un saggio ELISA comprendente le seguenti fasi:

(a) formare una prima miscela di reazione comprendente un'aliquota di campione e un substrato su cui sono disposte particelle virus-simili altamente purificate (HPVLP), e

25 (b) rilevare il livello di anticorpo anti-JCV legato a detto substrato su cui vengono

disposte HPVLP;

in cui il titolo dell'anticorpo anti-JCV viene espresso come un valore indice, in cui il valore indice viene determinato normalizzando un valore di densità ottica (optical density, OD) del campione a un calibratore di cut-off regolato per avere una nOD di 1, e un controllo positivo  
5 regolato per avere una nOD di 1,3; in cui il calibratore di cut-off e il controllo positivo comprendono una miscela di siero positivo per anticorpi anti-JCV e siero negativo per anticorpi anti-JCV, e in cui un controllo negativo comprende un siero negativo all'anticorpo anti-JCV e ha una nOD di 0,1;

e

10 ii) determinare il paziente che è a rischio elevato di sviluppare PML, se il valore indice di anticorpo anti-JCV viene determinato come  $>1,5$ .

Il metodo può inoltre comprendere:

(c) formare una seconda miscela di reazione contenente una seconda aliquota di campione e HPVLP in fase di soluzione, e rilevare il livello di anticorpo anti-JCV non legato in  
15 detta seconda miscela di reazione, come rilevando un anticorpo anti-JCV in grado di legare un substrato su cui è disposta HPVLP, ad esempio un substrato di HPVLP ad elevato rapporto segnale-rumore (come di discute nel presente, il metodo può comprendere classificare o assegnare, al campione, un valore indicativo del grado con cui l'incubazione con la HPVLP in fase solubile riduce il livello di anticorpo anti-JCV non legato nella seconda miscela di reazione,  
20 il quale valore è talvolta chiamato nel presente inibizione, inibizione % o simili. Questo valore può essere usato per valutare il campione o un paziente),

valutando pertanto il livello di anticorpo anti-JCV in un campione.

In una forma di realizzazione il metodo comprende inoltre:

(d) formare una terza miscela di reazione contenente una terza aliquota in condizioni  
25 dove gli anticorpi anti-JCV nel campione non sono legati da HPVLP o altro antigene, e rilevare

  
Ing. Ines Sangiacomo  
Consulente in F.I. n° USBM-041R

il livello di anticorpo anti-JCV nella terza miscela di reazione, come rilevando un anticorpo anti-JCV in grado di legare un substrato su cui sia disposta HPVLP, ad esempio un substrato di HPVLP a elevato rapporto segnale-rumore. L'inibizione o l'inibizione % può essere calcolata come una funzione del grado con cui l'incubazione con HPVLP in fase solubile [fase (c)] riduce  
5 la quantità di anticorpo anti-JCV non legato, rispetto al risultato nella fase (d).

In una forma di realizzazione il metodo comprende le fasi (a) e (b) e facoltativamente, fornire i risultati a un'altra entità, ad esempio un operatore sanitario.

In una forma di realizzazione il metodo comprende le fasi (a), (b) e (c) e facoltativamente, la fornitura di risultati a un'altra entità, ad esempio un operatore sanitario.

10 In una forma di realizzazione il metodo comprende le fasi (a), (b), (c) e (d) e facoltativamente, fornire i risultati a un'altra entità, ad esempio un operatore sanitario.

I metodi qui descritti usano livelli e quantità ottimizzati di reagenti, consentendo prestazioni migliorate. Pertanto, in una forma di realizzazione, per la prima miscela di reazione, da 20 ng a 60 ng, da 30 ng a 50 ng, da 20 ng a 40 ng, da 35 ng a 45 ng di HPVLP sono disposti  
15 su detto substrato. In una forma di realizzazione circa 20 ng, 30 ng, 40 ng, 50 ng o 60 ng di HPVLP sono disposti su detto substrato. Tipicamente, un dispositivo multi-substrato, ad esempio una piastra multi-pozzetto, una piastra multi-pozzetto in polistirene, ha una quantità di HPVLP qui specificata su ciascuno di una pluralità di substrati. Un substrato tipico è l'interno di un pozzetto su una piastra multi-pozzetto.

20 I metodi qui descritti usano rapporti ottimizzati di reagenti e campione, consentendo prestazioni migliorate. In una forma di realizzazione il rapporto tra  $\mu\text{l}$  di campione (questo si riferisce a un campione non diluito o alla quantità di campione in una diluizione, così 100  $\mu\text{l}$  di un 1  $\mu\text{l}$ :100  $\mu\text{l}$  di diluizione corrisponde a 1  $\mu\text{l}$  di campione), e ng di HPVLP disposta sul substrato nella prima reazione è: tra 1:100 e 1:20; 1:80 e 1:30; 1:60 e 1:20; 1:20 e 1:60; 1:30 e  
25 1:50. In una forma di realizzazione il rapporto tra  $\mu\text{l}$  di campione, ad esempio siero o plasma, e

ng di HPVLP disposto sul substrato è di circa: 1:30, 1:40, o 1:50. In una forma di realizzazione il rapporto tra  $\mu\text{l}$  di campione, e ng di HPVLP disposto sul substrato è circa: (da 0,08 a 1,2):30, (da 0,08 a 1,2):40, o (da 0,08 a 1,2):50.

In una forma di realizzazione, il campione, ad esempio siero, per la prima reazione è diluito, come circa 100 volte, in tampone, ad esempio, prima di metterlo a contatto con il substrato su cui è disposto HPVLP, ad esempio un substrato di HPVLP a elevato rapporto segnale-rumore. In una forma di realizzazione, la rilevazione è con un anticorpo marcato con un enzima, ad esempio una IgG marcata con un enzima, come una IgG marcata con una HRP (perossidasi di rafano). In un altro caso, il reagente di rilevazione, ad esempio una IgG marcata con HRP, è aggiunto a una concentrazione di almeno 0,01  $\mu\text{g/ml}$ , 0,02  $\mu\text{g/ml}$ , 0,03  $\mu\text{g/ml}$ , 0,04  $\mu\text{g/ml}$ , 0,05  $\mu\text{g/ml}$ , 0,06  $\mu\text{g/ml}$  o 0,08  $\mu\text{g/ml}$ . In una forma di realizzazione, il reagente di rilevazione è fornito da 10x a 100x in eccesso rispetto all'anticorpo legato al substrato. In una forma di realizzazione il reagente di rilevazione è fornito in una quantità che è uguale a o maggiore di 10x, 20x, 50x, 75x o 100x) in eccesso rispetto all'anticorpo legato al substrato.

In una forma di realizzazione HPVLP in fase di soluzione in (c) è presente con da 2x a 100x particelle in eccesso rispetto all'anticorpo anti-JCV nella seconda miscela di reazione o campione. In una forma di realizzazione l'eccedenza di particelle rispetto all'anticorpo anti-JCV nella seconda miscela di reazione o campione è uguale a o maggiore di 2x, 4x, 5x, 10x, 15x, 20x, 40x, 50x, 70x, 80x, 100x o 110x.

In una forma di realizzazione, per la seconda miscela di reazione, da 20 ng a 60 ng, da 30 ng a 50 ng, da 20 ng a 40 ng, da 35 ng a 45 ng di HPVLP sono disposti su detto substrato. In una forma di realizzazione circa 20 ng, 30 ng, 40 ng, 50 ng o 60 ng di HPVLP sono disposti su detto substrato. Tipicamente, un dispositivo multi-substrato, ad esempio una piastra multi-pozzetto, una piastra multi-pozzetto in polistirene, ha una quantità di HPVLP qui specificata su ciascuno di una pluralità di substrati. Un substrato tipico è l'interno di un pozzetto su una piastra

multi-pozzetto.

In una forma di realizzazione, per la seconda miscela di reazione il campione è messo a contatto con HPVLP in fase solubile e quindi all'anticorpo anti-JCV non legato è consentito legare HPVLP disposta su un substrato. In una forma di realizzazione, per la seconda miscela di  
5 reazione, il campione è a contatto simultaneo con HPVLP in fase solubile e HPVLP disposta su un substrato.

In una forma di realizzazione il rapporto tra  $\mu\text{l}$  di campione (questo si riferisce al campione non diluito o alla quantità di campione in una diluizione, quindi 100  $\mu\text{l}$  di una diluizione 1  $\mu\text{l}$ :100  $\mu\text{l}$  equivalgono a 1  $\mu\text{l}$  di campione) e ng di HPVLP disposta sul substrato è:  
10 tra 1:100 e 1:20; 1:80 e 1:30; 1:60 e 1:20; 1:20 e 1:60; 1:30 e 1:50. In una forma di realizzazione il rapporto tra  $\mu\text{l}$  di campione, e ng di HPVLP disposto sul substrato è circa: 1:30, 1:40, o 1:50. In un caso il rapporto tra  $\mu\text{l}$  di campione, e ng di HPVLP disposto sul substrato è circa: (da 0,08 a 1,2):30, (da 0,08 a 1,2):40, o (da 0,08 a 1,2):50.

In una forma di realizzazione, il campione, ad esempio siero, è diluito, come di circa  
15 100 volte in, ad esempio, tampone, prima di metterlo a contatto con il substrato su cui è disposta HPVLP, ad esempio un substrato di HPVLP a elevato rapporto segnale-rumore. In una forma di realizzazione, la rilevazione avviene con un anticorpo marcato con enzima, ad esempio una IgG marcata con enzima, come una IgG marcata con HRP. In una forma di realizzazione, il reagente di rilevazione, ad esempio una IgG marcata con HRP, è aggiunto a una concentrazione di  
20 almeno 0,01  $\mu\text{g/ml}$ , 0,02  $\mu\text{g/ml}$ , 0,03  $\mu\text{g/ml}$ , 0,04  $\mu\text{g/ml}$ , 0,05  $\mu\text{g/ml}$ , 0,06  $\mu\text{g/ml}$  o 0,08  $\mu\text{g/ml}$ . In una forma di realizzazione, il reagente di rilevazione è fornito da 10x a 100x in eccesso rispetto all'anticorpo legato al substrato. In una forma di realizzazione il reagente di rilevazione è fornito in una quantità che è uguale a o maggiore di 10x, 20x, 50x, 75x o 100x) in eccesso rispetto all'anticorpo legato al substrato.

25 In una forma di realizzazione, concordemente al livello di anticorpi anti-JCV rilevati

  
Ing. Ines Sangiacomo  
Consulente in F.I. n° USBM-041R

nella fase (b), si eseguono le fasi (c) e/o (d).

In una forma di realizzazione, concordemente al livello di anticorpi anti-JCV rilevati nella fase (b), ad esempio il livello indice (nOD) è  $>0,2$  ed è  $<0,4$ , quindi si eseguono le fasi (c) e (d).

5 In una forma di realizzazione, il campione di siero o plasma, è diluito, come di una quantità uguale a o maggiore di circa 50, 100 o 150 volte in, ad esempio, tampone, prima di formare detta seconda miscela di reazione. In un'altra forma di realizzazione, il campione è diluito, come di una quantità uguale a o maggiore di circa 50 volte, 100 volte o 150 volte in, ad esempio, tampone, prima di formare detta terza miscela di reazione. In un'altra forma di  
10 realizzazione, la rilevazione di una o entrambe la seconda e la terza miscela di reazione avviene con un anticorpo marcato con un enzima, ad esempio una IgG marcata con un enzima, ad esempio una IgG marcata con HRP.

La rilevazione di una o entrambe la seconda e la terza miscela di reazione può avvenire con una IgG marcata con HRP, aggiunta a una concentrazione di almeno 0,01, 0,02, 0,03, 0,04,  
15 0,05, 0,06 o 0,08  $\mu\text{g/ml}$ . In un caso, il reagente di rilevazione è fornito con un'eccedenza di 10x, 100x (ad esempio, 10x, 20x, 50x, 75x o 100x) rispetto all'anticorpo legato al substrato.

Nell'invenzione valutare il livello di anticorpo anti-JCV in un campione include anche un calibratore di cut-off, avente un indice di circa 1

In una forma di realizzazione il metodo include determinare la quantità che legandosi a  
20 dette particelle HPVLP in fase solubile inibisce o riduce il legame alle particelle HPVLP disposte sul substrato, rispetto al legame alle particelle HPVLP disposte sul substrato in detta prima aliquota. I risultati della prima fase del saggio in due fasi (fase [a] e [b] *supra*) sono tipicamente espressi come un valore di OD normalizzato (nOD o "indice"). I risultati della seconda fase del saggio a due fasi (fase [c] e facoltativamente [d] *supra*) sono tipicamente  
25 espressi come "inibizione percentuale". In una forma di realizzazione nOD è OD<sub>450</sub>. In una

forma di realizzazione detta inibizione è inferiore a o uguale a un valore predeterminato, ad esempio il 45% e detto campione è classificato come negativo.

In una forma di realizzazione detta inibizione è maggiore di un valore predeterminato, ad esempio il 45% e detto campione è classificato come positivo.

5 Secondo l'invenzione, un calibratore di cut-off (CO) è regolato per avere un indice di reattività (nOD) di circa 1,0 e un controllo positivo (CP) è regolato per avere un indice di reattività di circa 1,3. Le soluzioni di CO e CP sono eseguite miscelando un siero positivo agli anticorpi contro JCV con un siero che è negativo agli anticorpi contro JCV. Per il controllo negativo (CN) che può essere, ad esempio, un flacone di sieri negativi all'anticorpo anti-JCV,  
10 l'obiettivo dell'indice (nOD) è circa 0,1.

Una HPVLP può essere cromatograficamente purificata prima dell'uso in un saggio indicato nell'invenzione. In una forma di realizzazione il campione è un campione di siero diluito 1:101 prima di formare la prima miscela di reazione comprendente una prima aliquota del campione e il substrato su cui sono disposte le HPVLP.

15 In un'altra forma di realizzazione, il reagente di rilevazione secondario (ad esempio, una IgG anti-umana) è coniugato con un agente rilevabile, come una perossidasi, come una HRP. In una forma di realizzazione, il reagente di rilevazione secondario può essere IgG anti-umana, in cui la IgG anti-umana è coniugata a HRP. In un'altra forma di realizzazione, la soluzione del reagente di rilevazione contenente IgG-HRP è usata a 0,04 µg/ml. Ad esempio, 0,8 mg/ml di  
20 una soluzione madre di IgG-HRP sono diluiti 1:15.000, 1:20.000, 1:30.000 o più prima dell'uso nel saggio per rilevare il livello di anticorpo anti-JCV legato HPVLP. In un'altra forma di realizzazione, la concentrazione del reagente di rilevazione secondario è regolata per i nuovi lotti in modo da corrispondere al segnale del lotto precedente e il tempo di incubazione con il coniugato è di soli 30 minuti. In una forma di realizzazione, TMB (tetrametilbenzidina) e  
25 perossido di idrogeno nel tampone sono incubati con la miscela di reazione contenente la

miscela HRP IgG legata all'anticorpo anti-JCV per 20 minuti,  $\pm$  2 minuti.

Una riduzione nel livello rilevato nel campione di saggio secondario rispetto al campione che non era stato preincubato indica che il campione è positivo all'anticorpo anti-JCV e una variazione nel livello rilevato al di sotto di una percentuale specifica indica che non vi è  
5 anticorpo anti-JCV presente nel campione.

Il campione può essere determinato che il campione abbia un valore indice (vale a dire, valore nOD)  $>0,2$  e  $<0,4$  (la "zona indeterminata") dopo la prima fase del saggio, che è la formazione di una prima miscela di reazione comprendente una prima aliquota di campione e un substrato su cui è disposta HPVLP, ad esempio un substrato di HPVLP con elevato rapporto  
10 segnale-rumore e rilevare il livello di anticorpo anti-JCV legato a detto substrato su cui è disposta HPVLP, ad esempio un substrato di HPVLP a elevato rapporto segnale-rumore. Una seconda aliquota del campione può quindi essere testata nella seconda fase del saggio, che comprende la formazione di una seconda miscela tra la seconda aliquota e una HPVLP in fase di soluzione prima di rilevare l'anticorpo anti-JCV non legato nella seconda miscela mettendo a  
15 contatto la seconda miscela con un substrato su cui è disposta HPVLP, ad esempio un substrato di HPVLP a elevato rapporto segnale-rumore.

Il campione si è determinato che il campione abbia un valore indice  $<0,2$  dopo la prima fase del saggio, allora si determina che il campione sia negativo per l'anticorpo anti-JCV. Un campione determinato per essere negativo per l'anticorpo anti-JCV può non essere valutato  
20 usando la seconda fase del saggio.

Se si determina che il campione abbia un valore indice  $> 0,4$  dopo la prima fase del saggio, allora il campione è determinato essere positivo per l'anticorpo anti-JCV. Un campione determinato essere positivo per l'anticorpo anti-JCV può non essere valutato usando la seconda fase per il saggio.

25 I metodi descritti nel presente si basano almeno in parte sulla scoperta per cui il titolo

anticorpale anti-JCV e altre caratteristiche come affinità/avidità possono essere indicatori del rischio di un paziente di sviluppare la leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML).

Di conseguenza, l'invenzione prevede un metodo per valutare il rischio di un paziente di sviluppare PML, comprendente acquisire la conoscenza di un titolo anticorpale per il virus JC  
5 (JCV) (ad esempio determinato come descritto nel presente ed espresso come densità ottica normalizzata [nOD] o indice) come definito nelle rivendicazioni.

In una forma di realizzazione, un titolo anticorpale anti-JCV o inibizione percentuale è determinato in un campione biologico derivato a un paziente, come un campione di sangue (siero o plasma) o campione di CSF.

10 Se il titolo o/e inibizione percentuale o una funzione di entrambi i valori è determinato essere al di sotto di un livello predeterminato, il paziente è determinato essere a rischio inferiore di sviluppare PML e se il titolo e/o inibizione percentuale o una funzione di entrambi i valori è determinato essere pari o superiore al livello predeterminato, il paziente è determinato essere a rischio maggiore di sviluppare PML.

15 In una forma di realizzazione, il soggetto ha la sclerosi multipla, ad esempio un paziente con sclerosi multipla che riceve già la terapia con un anticorpo anti-VLA-4, ad esempio natalizumab.

Il paziente può essere determinato come a maggiore rischio di sviluppare PML e il paziente può essere identificato come qualcuno che deve ricevere una terapia alternativa, ad  
20 esempio il paziente deve interrompere la terapia con anticorpo anti-VLA-4, ad esempio natalizumab e, ad esempio, ricevere una terapia alternativa, ad esempio una terapia alternativa approvata per la sclerosi multipla come Avonex®. Il paziente può essere determinato come a maggiore rischio di sviluppare PML e al paziente può essere somministrata terapia anticorpale anti-VLA-4, ad esempio natalizumab.

25 Il paziente si determina essere a maggiore rischio di sviluppare PML sulla base del

  
Ing. Ines Sangiacomo  
Consulente in F.I. n° USBM-041R

titolo anticorpale anti-JCV o inibizione percentuale e il paziente può essere identificato come qualcuno che deve ricevere test aggiuntivi per determinare il rischio di sviluppare PML.

L'inibizione percentuale di anticorpi anti-JCV può essere misurata, ad esempio: (i) mettendo a contatto un campione biologico del soggetto con HPVLP in una soluzione in  
5 condizioni idonee per legare un anticorpo anti-JCV nel campione a una HPVLP; (ii) separando gli anticorpi contro JCV legati a HPVLP dalla soluzione per creare un campione secondario; (iii) mettendo a contatto il campione secondario con HPVLP alle stesse condizioni di (i) e (iv) rilevando il livello di anticorpo anti-JCV legantesi a HPVLP nel campione secondario.

Il titolo anticorpale anti-JCV può essere misurato mediante una piattaforma  
10 commerciale, come il saggio VIDAS® (bioMérieux), o una piattaforma alternativa, come un metodo in fase di soluzione o un metodo di flusso laterale.

Se il saggio indica che il campione biologico non contiene anticorpi contro JCV e il saggio include inoltre: (iv) mettere a contatto una porzione del campione biologico dal soggetto con HPVLP in una soluzione prima della fase (i) e dove la HPVLP della fase (i) è attaccata a un  
15 substrato solido, in modo da fornire un campione secondario; (v) mettere a contatto il campione secondario con HPVLP alle stesse condizioni di (i); (vi) rilevare il livello di anticorpo anti-JCV legantesi a HPVLP nel campione secondario e (vii) confrontare il livello rilevato di anticorpo anti-JCV nel campione secondario con il livello di legame nel campione biologico quando incubato con la soluzione senza HPVLP. Una diminuzione del livello rilevato nel campione  
20 preincubato con HPVLP rispetto al campione incubato in soluzione indica che il campione è positivo per un anticorpo anti-JCV e la mancanza di variazioni nel livello rilevato indica che l'anticorpo anti-JCV non è presente oltre livelli di fondo nel campione.

Se il saggio indica che il campione biologico contiene anticorpi contro JCV, il paziente può essere determinato come a maggiore rischio di PML.

25 Il paziente può essere determinato come a un rischio inferiore di PML se il titolo

anticorpale anti-JCV come indicato dal valore indice o nOD è determinato essere  $<0,5$  il paziente può essere determinato come avente un maggiore rischio se il titolo anticorpale anti-JCV come indicato dal valore indice o nOD è determinato essere  $>0,5$  e  $<1,5$  o il paziente si determina avere un ancora maggiore rischio se il titolo anticorpale anti-JCV come indicato dal  
5 valore indice o nOD è determinato essere  $>1,5$ .

Se il saggio indica che il campione biologico non contiene anticorpi contro JCV oltre il livello di fondo e che il paziente può essere determinato come a rischio inferiore di PML.

L'efficacia di un saggio di anticorpo anti-JCV può essere rivalutata a un intervallo predeterminato, come ogni 6 mesi od ogni anno. In un saggio di controllo esemplificativo, una  
10 raccolta di campioni, ad esempio 30, 40 o 50 campioni di siero e 30, 40 o 50 campioni di plasma sono forniti per valutazione mediante l'attuale metodo ottimizzato e un metodo di epoca antecedente. La concordanza tra i risultati è valutata e se si riscontra che la concordanza supera, ad esempio, il 90% o 95%, l'esecuzione del saggio può essere determinata essere accettabile. In una forma di realizzazione, un pannello di campioni, ad esempio, contenenti 90, 100, 150 o più  
15 campioni, con stato dell'anticorpo anti-JCV noto può essere utilizzato per valutare la coerenza dell'esecuzione del saggio nel tempo. La concordanza tra i risultati è valutato e se la concordanza si riscontra essere superiore al, ad esempio, 90% o 95%, l'esecuzione del saggio può essere determinata come accettabile. Il pannello di campioni è sieri di paziente disponibili in volume sufficiente per creare una banca di campioni.

20 Un'entità, ad esempio un operatore sanitario, può acquisire informazioni derivanti da un saggio anticorpale anti-JCV qui descritto e corrispondente alle informazioni, somministrare un trattamento qui descritto al paziente, ad esempio un paziente con SM.

Un saggio JCV qui descritto può essere eseguito su un paziente, e quindi il paziente è trattato, ad esempio, il paziente con SM può essere trattato sulla base dei risultati del saggio.

25 Il titolo anticorpale anti-JCV o l'inibizione percentuale in un paziente può essere

  
Ing. Ines Sangiacomo  
Consulente in F.I. n° USBM-041R

rivalutato a intervalli regolati, come ogni 3 mesi, ogni 6 mesi od ogni 12 mesi o a intervalli più lunghi o più frequentemente. Un aumento osservato del titolo anticorpale o dell'inibizione percentuale può indicare un aumento del rischio del paziente di sviluppare PML. Ad esempio, un aumento pari a 2 volte o 3 volte del titolo anticorpale (nOD o indice) può indicare un rischio  
5 aumentato di PML. Un paziente che riceve una terapia anti-VLA-4, come natalizumab, può interrompere la terapia con la terapia anti-VLA-4 e facoltativamente iniziare una terapia con un agente alternativo, ad esempio, un immunosoppressore diverso da una terapia anti-VLA-4 o diverso da natalizumab. Un aumento del titolo può presentarsi in maniera diversa nei pazienti aventi un titolo basale alto (ad esempio, con un intervallo più stretto nell'intervallo di titoli)  
10 rispetto a pazienti aventi un titolo basale basso.

In una forma di realizzazione, un paziente che riceve un anticorpo anti-VLA-4, ad esempio natalizumab, può essere monitorato, ad esempio ogni cinque, sei, sette, otto, nove, dieci, undici, dodici, quindici, venti, trenta, quaranta mesi per il titolo anticorpale anti-JCV e/o inibizione percentuale.

15 In un'altra forma di realizzazione, un paziente non è rivalutato per la presenza di anticorpi contro JCV o per titolo anticorpale anti-JCV o inibizione percentuale entro una o due o tre settimane dopo avere ricevuto plasmateresi. In un'altra forma di realizzazione, un paziente non è rivalutato per la presenza di anticorpi contro JCV o per il titolo anticorpale anti-JCV o inibizione percentuale entro una o due o tre settimane dopo avere ricevuto trattamento con  
20 immunoglobulina per via endovenosa (IVIG).

La misura di titolo anticorpale anti-JCV è in termini di nOD o un valore indice.

La valutazione di un paziente come qui descritta può essere condotta prima della somministrazione di una terapia anti-VLA-4 o dopo che il paziente abbia iniziato una terapia anti-VLA-4.

25 Il paziente può essere monitorato a intervalli regolari, ad esempio ogni 3 mesi, ogni 6

mesi, ogni anno o più o meno frequentemente, per una diminuzione del titolo anticorpale anti-JCV o una diminuzione dell'inibizione percentuale di anticorpi contro JCV. Una diminuzione del titolo anticorpale anti-JCV o una diminuzione dell'inibizione percentuale di anticorpi contro JCV può indicare che il paziente ha un rischio inferiore di sviluppare PML.

5           Dopo che è stato determinato che un paziente è ad rischio maggiore di PML; allora il paziente può non essere sottoposto nuovamente a test per lo stato di JCV. Ad esempio, il paziente può interrompere la terapia con una terapia anti-VLA-4 come natalizumab e non essere sottoposto ancora a test per lo stato dell'anticorpo anti-JCV.

10           In una forma di realizzazione, un metodo di valutazione di un paziente come qui descritto, come determinare un titolo anticorpale anti-JCV o inibizione percentuale, può inoltre includere valutare altre misure di fattori predittivi del rischio. Ad esempio, un metodo per valutare un paziente può includere inoltre: (A) determinare se il paziente abbia ricevuto  
15           trattamento prolungato con una terapia anti-VLA-4 (ad esempio, oltre 24 mesi); o (b) determinare se il paziente abbia ricevuto una terapia con immunosoppressore non anti-VLA-4  
(ad esempio, mitoxantrone o altre terapie negli ultimi 2, 3, 5 anni o da sempre nella vita del  
20           paziente). Il rischio relativo di PML per un paziente che abbia un titolo anticorpale anti-JCV o inibizione percentuale superiore a un livello predeterminato, ma non abbia fatto precedentemente uso di immunosoppressori specifici e non si sia sottoposto a trattamento prolungato con una terapia anti-VLA-4 è inferiore al rischio relativo di un paziente che abbia un  
25           titolo anticorpale anti-JCV o inibizione percentuale al di sotto di un livello predeterminato e abbia fatto precedentemente uso di immunosoppressori specifici o si sia sottoposto a trattamento prolungato con una terapia anti-VLA-4, che è inferiore al rischio relativo di un paziente che abbia un titolo anticorpale anti-JCV o inibizione percentuale superiore a un livello predeterminato e abbia fatto precedentemente uso di immunosoppressori specifici e si sia sottoposto a trattamento prolungato con una terapia anti-VLA-4.

In alcune forme di realizzazione, fattori da includere nel modello di stratificazione sono l'età o il sesso del paziente.

Il metodo qui descritto può incorporare uno o più fattori nella valutazione del paziente.

Il metodo può includere, ad esempio, acquisire o determinare un titolo anticorpale del virus JC (JCV) e inibizione percentuale in un campione biologico dal paziente, ad esempio con un metodo qui descritto. Se il titolo anticorpale o l'inibizione percentuale è determinata essere inferiore a un livello predeterminato, allora il paziente può essere classificato come idoneo per il trattamento con una prima categoria di terapia, come una terapia anti-VLA-4, ad esempio natalizumab. Se il titolo anticorpale o l'inibizione percentuale è determinato essere pari o superiore al livello predeterminato il paziente è classificato essere idoneo per una seconda categoria di terapia, ad esempio interferone, glatiramer acetato o un corticosteroide. L'acquisizione di un titolo anticorpale anti-JCV e inibizione percentuale in un campione di un paziente può includere asportare un campione biologico dal corpo del paziente o analizzare un campione derivato dal paziente. Il metodo di valutazione può includere anche somministrare una terapia, come dalla prima categoria (ad esempio natalizumab) o la seconda categoria (ad esempio, interferone, glatiramer acetato o un corticosteroide) al paziente.

Il paziente si determina avere un maggiore rischio di PML se (i) il titolo anticorpale anti-JCV come indicato dal valore indice o nOD è determinato essere  $>1,5$  e il valore dell'inibizione percentuale è determinato essere  $>70\%$

Come discusso *supra*, metodi di valutazione di un paziente possono incorporare più di una considerazione o fattore. Pertanto, metodi di valutazione di un paziente possono inoltre includere:

(aa) determinare se il paziente ha ricevuto un trattamento prolungato con una terapia anti-VLA-4 (ad esempio oltre 24 mesi) e fornire una classificazione di esposizione a una terapia anti-VLA-4 precedete; o

(bb) determinare se il paziente ha ricevuto una terapia immunosoppressiva non anti-VLA-4 specifica (ad esempio negli ultimi 2, 3, 5 anni o da sempre nella vita del paziente) e fornire una classificazione dell'esposizione immunosoppressiva precedente.

5 Tipicamente, un paziente che abbia un titolo anticorpale anti-JCV o inibizione percentuale superiore a un livello predeterminato ma non abbia usato in precedenza immunosoppressori specifici e non abbia avuto un trattamento prolungato con una terapia anti-VLA-4 è classificato come avere un rischio inferiore di sviluppare PML rispetto al rischio relativo di un paziente che abbia un titolo anticorpale anti-JCV o inibizione percentuale superiore a un livello predeterminato e abbia utilizzato immunosoppressori specifici in  
10 precedenza e un trattamento prolungato con una terapia anti-VLA-4.

In una forma di realizzazione, il paziente ha ricevuto precedentemente una terapia anti-VLA-4. In un'altra forma di realizzazione, il metodo include somministrare una terapia anti-VLA-4, ad esempio natalizumab al paziente.

15 In una forma di realizzazione, il paziente è classificato come un candidato per la terapia anti-VLA-4 e al paziente è ulteriormente somministrata la terapia anti-VLA-4.

Pazienti che hanno ricevuto una terapia anti-VLA-4, come natalizumab per 24 mesi o meno, che non abbiano precedentemente ricevuto una terapia immunosoppressiva (diversa dalla terapia anti-VLA-4) e il cui test per esposizione a JCV sia negativo (ad esempio, negativo ad anticorpi contro JCV) tipicamente hanno il rischio più basso di sviluppare PML. Al contrario,  
20 pazienti che hanno ricevuto terapia anti-VLA-4 per oltre 24 mesi, che abbiano ricevuto precedentemente una terapia immunosoppressiva (diversa da una terapia anti-VLA-4) e il cui test per esposizione a JCV sia positivo (ad esempio, positivo agli anticorpi contro JCV) hanno tipicamente il rischio massimo di sviluppare PML.

25 Un livello di rischio di PML di un paziente può essere valutato valutando uno o qualsiasi due o tutti e tre i fattori di rischio identificati. Ad esempio, un paziente, ad esempio un

paziente con sclerosi multipla (SM) il cui test per il titolo anticorpale anti-JCV sia negativo si può determinare come avere un rischio inferiore di PML. Un paziente con un rischio inferiore di PML può avere un rischio inferiore a circa 0,2/1000 pazienti, ad esempio  $\leq 0,11/1000$ .

Un paziente, ad esempio un paziente con SM, che ha ricevuto una terapia anti-VLA-4, come natalizumab, per 24 mesi o meno (ad esempio, per 23 mesi, 22 mesi, 20 mesi, 15 mesi, 12 mesi, 6 mesi, 1 mese o meno) e chi non ha precedentemente ricevuto una terapia immunosoppressiva può essere determinato ad avere un rischio più basso per la PML. Ad esempio, il paziente può essere determinato avere un rischio di PML di circa 0,54/1000 pazienti. Di conseguenza, il paziente può essere considerato candidato a ricevere un ulteriore trattamento con una terapia anti-VLA-4, come il natalizumab.

Un paziente che ha ricevuto una terapia anti-VLA-4, come natalizumab, per più di 24 mesi, ad esempio da circa 25 a 48 mesi o più (ad esempio, 26, 28, 30, 36, 40, o 48 mesi o più) e chi non ha precedentemente ricevuto una terapia immunosoppressiva può essere determinato essere, o classificato come avente, un rischio più elevato di PML. Un paziente a più alto rischio di PML può avere un rischio  $\geq$  di circa 3,7/1000 pazienti, ad esempio, circa 1,37/1000 pazienti. Di conseguenza, il paziente può essere considerato candidato a ricevere un ulteriore trattamento con una terapia anti-VLA-4, come il natalizumab.

Un paziente che ha ricevuto una terapia anti-VLA-4, come natalizumab, per 24 mesi o meno (ad esempio, per 24 mesi, 22 mesi, 20 mesi, 15 mesi, 12 mesi, 6 mesi, 1 mese o meno) e che è determinato essere negativo per gli anticorpi anti-JCV, o l'acido nucleico di JCV, può essere determinato essere, o classificato come avente, un rischio più basso per PML. Ad esempio, il paziente può essere determinato a rischio di  $\leq 0,2/1000$  pazienti. Di conseguenza, il paziente può essere considerato candidato a ricevere un ulteriore trattamento con una terapia anti-VLA-4, come il natalizumab.

Un paziente che non ha ricevuto un precedente trattamento con un immunosoppressore

(diverso da una terapia anti-VLA-4) e che è determinato essere negativo per JCV, è determinato avere un rischio più basso di PML, ad esempio,  $\leq 0,2/1000$  pazienti. Di conseguenza, il paziente può essere considerato candidato a ricevere un ulteriore trattamento con una terapia anti-VLA-4, come il natalizumab.

5 Un paziente che ha ricevuto una terapia anti-VLA-4, come natalizumab, per più di 24 mesi (ad esempio, per 25 mesi, 26 mesi, 28 mesi, 30 mesi, 35 mesi, 38 mesi, 40 mesi, 48 mesi o più) e che ha precedentemente ricevuto una terapia immunosoppressiva diversa da una terapia anti-VLA-4 può essere determinato avere un rischio più elevato di PML. Un paziente a più alto rischio di PML può avere un rischio di circa  $0,37/1000$  o maggiore, ad esempio, circa  $4,3/1000$   
10 pazienti. Di conseguenza, il paziente può essere determinato non essere un candidato a ricevere un ulteriore trattamento con una terapia anti-VLA-4, come il natalizumab, o può essere determinato per candidarsi a ricevere un trattamento con una terapia anti-VLA-4 accompagnata da monitoraggio più frequente. Ad esempio, un paziente a più alto rischio di PML che riceve una terapia con una terapia anti-VLA-4 può ricevere un monitoraggio più frequente per lo  
15 sviluppo della PML, di un paziente a minor rischio di PML.

Un paziente che ha ricevuto una terapia anti-VLA-4, come natalizumab, per 24 mesi o meno (ad esempio, per 24 mesi, 22 mesi, 20 mesi, 15 mesi, 12 mesi, 6 mesi, 1 mese o meno) e ha precedentemente ricevuto una terapia immunosoppressiva diversa da una terapia anti-VLA-4 può essere determinato avere un rischio più elevato di PML. Ad esempio, il paziente può essere  
20 determinato avere un rischio di PML di  $0,66/1000$  pazienti. Di conseguenza, il paziente può essere determinato per non essere un candidato a ricevere un ulteriore trattamento con una terapia anti-VLA-4, come il natalizumab, o può essere determinato per candidarsi a ricevere un trattamento con una terapia anti-VLA-4 accompagnata da monitoraggio più frequente. Ad esempio, un paziente a più alto rischio di PML che riceve una terapia con una terapia anti-VLA-  
25 4 può ricevere un monitoraggio più frequente per lo sviluppo della PML, di un paziente a minor

rischio di PML.

Un paziente che ha ricevuto una terapia anti-VLA-4, come natalizumab, per più di 24 mesi (ad esempio, per 25-48 mesi, ad esempio 26, 30, 36, 42 o 48 mesi o più a lungo), e chi è determinato essere positivo per JCV, può essere determinato avere un rischio più elevato per la PML. Il paziente può quindi essere determinato per non essere un candidato a ricevere un ulteriore trattamento con una terapia anti-VLA-4, o può essere determinato per candidarsi a ricevere un trattamento con una terapia anti-VLA-4 accompagnata da un monitoraggio più frequente.

In una forma di realizzazione, un paziente che ha ricevuto una terapia anti-VLA-4, come natalizumab, per più di 24 mesi (ad esempio, per 25-48 mesi, come 26, 30, 36, 42 o 48 mesi o più a lungo), e chi non ha ricevuto un precedente trattamento con un immunosoppressore (diverso da una terapia anti-VLA-4), e che è determinato essere positivo per JCV ed è determinato avere un rischio più elevato di PML. Ad esempio, il paziente può essere determinato avere un rischio di PML di 4/1000 pazienti. Il paziente può quindi essere determinato per non essere un candidato a ricevere un ulteriore trattamento con una terapia anti-VLA-4, o può essere determinato per candidarsi a ricevere un trattamento con una terapia anti-VLA-4 accompagnata da un monitoraggio più frequente.

Un paziente, ad esempio, un paziente con SM, che ha ricevuto un precedente trattamento con un immunosoppressore diverso da una terapia anti-VLA-4, e che è determinato essere positivo per gli anticorpi anti-JCV o acido nucleico di JC, può essere determinato essere a più alto rischio di PML. Di conseguenza, il paziente può essere determinato per non essere un candidato a ricevere un ulteriore trattamento con una terapia anti-VLA-4, o può essere determinato per candidarsi a ricevere un trattamento con una terapia anti-VLA-4 accompagnata da un monitoraggio più frequente.

Un paziente che ha ricevuto un precedente trattamento con un immunosoppressore

diverso da una terapia anti-VLA-4 e che è determinato essere positivo per gli anticorpi anti-JCV o acido nucleico di JCV e che ha ricevuto un la terapia anti-VLA-4, come il natalizumab, per un periodo superiore a 24 mesi (ad esempio, per 25-48 mesi, come 26, 30, 36, 42 o 48 mesi o più) può essere determinato per un rischio più elevato per PML. Ad esempio, il paziente può essere  
5 determinato avere un rischio di 9,8/1000 pazienti. Di conseguenza, il paziente può essere determinato per non essere un candidato a ricevere un ulteriore trattamento con una terapia anti-VLA-4, o può essere determinato per candidarsi a ricevere un trattamento con una terapia anti-VLA-4 accompagnata da un monitoraggio più frequente.

Un paziente che ha ricevuto una terapia anti-VLA-4, come natalizumab, per 24 mesi o  
10 meno (ad esempio, per 24 mesi, 22 mesi, 20 mesi, 15 mesi, 12 mesi, 6 mesi, 1 mese o meno) e che ha ricevuto un precedente trattamento con un immunosoppressore diverso da una terapia anti-VLA-4 e che è determinato per essere positivo per JCV, può essere determinato per avere un rischio più elevato per la PML. Ad esempio, il paziente può essere determinato per avere un rischio di PML di 4,5/1000 pazienti. Il paziente può quindi essere determinato per non essere un  
15 candidato a ricevere un ulteriore trattamento con una terapia anti-VLA-4, o può essere determinato per candidarsi a ricevere un trattamento con una terapia anti-VLA-4 accompagnata da un monitoraggio più frequente.

Un paziente che ha ricevuto una terapia anti-VLA-4, come natalizumab, per 24 mesi o meno (ad esempio, per 24 mesi, 22 mesi, 20 mesi, 15 mesi, 12 mesi, 6 mesi, 1 mese o meno), e  
20 che non ha ricevuto un precedente trattamento con un immunosoppressore (diverso da una terapia anti-VLA-4), e che è determinato per essere positivo per JCV, può essere determinato per essere a più alto rischio per PML . Ad esempio, il paziente può essere determinato per avere un rischio di PML di 0,35/1000 pazienti. Il paziente può quindi essere determinato per non essere un candidato a ricevere un ulteriore trattamento con una terapia anti-VLA-4, o può essere  
25 determinato per candidarsi a ricevere un trattamento con una terapia anti-VLA-4 accompagnata

da un monitoraggio più frequente.

Un paziente determinato per avere un rischio più basso di sviluppare PML può essere determinato per avere un rischio  $\leq$  circa 0,54/1000 pazienti, ad esempio,  $\leq$  0,25/1000,  $\leq$  0,2/1000, 0,19/1000,  $\leq$  0,15/1000,  $\leq$  0,11/1000,  $\leq$  0,1/1000, ad esempio, 0,3/1000, 0,25/1000, 5 0,2/1000, 0,19/1000, 0,15/1000, 0,11/1000, o 0,1/1000 o inferiore. Un paziente determinato per avere un rischio più elevato di PML può essere determinato per avere un rischio di circa 0,54/1000 o maggiore, ad esempio, circa 0,55/1000, circa 0,60/1000, circa 0,66/1000, circa 1,2/1000, circa 1,37/1000, circa 2,0/1000, circa 2,5/1000, circa 3,0/1000, circa 4,3/1000, circa 5,0/1000, circa 7,8/1000, circa 8,0/1000 o superiore. Ad esempio, un paziente determinato per 10 avere un rischio più elevato di PML può essere determinato per avere un rischio di 0,3/1000, 0,35/1000, 0,5/1000, 0,66/1000, 1,2/1000, 1,37/1000, 2,0/1000, 2,5/1000, 3,0/1000, 4,3/1000, 5,0/1000, 7,8/1000, 8,0/1000 o superiore.

Un paziente che ha ricevuto un precedente trattamento con una terapia anti-VLA-4 per più di 24 mesi e che non ha ricevuto una precedente terapia con un immunosoppressore diverso 15 dalla terapia anti-VLA-4 e che è determinato per essere negativo a JCV, può essere determinato per essere a minor rischio di sviluppare PML e quindi un candidato idoneo a ricevere un ulteriore trattamento con una terapia anti-VLA-4, come il natalizumab. Tuttavia, a causa della somministrazione di terapia anti-VLA-4 per più di 24 mesi, la valutazione del rischio può includere una raccomandazione per monitorare il paziente più frequentemente per lo sviluppo di 20 sintomi avversi, come i sintomi che potrebbero indicare lo sviluppo di PML.

Il monitoraggio avanzato dei pazienti per lo sviluppo della PML può includere una maggiore frequenza di test per identificare la presenza di JCV, ad esempio aumento dei test mediante analisi degli anticorpi anti-JCV o analisi basate sull'acido nucleico. Il monitoraggio avanzato può includere anche la risonanza magnetica per identificare le lesioni cerebrali dovute 25 alla PML.

Un paziente che ha anticorpi anti-JCV inferiori rispetto a un criterio preselezionato può avere un livello non rilevabile di anticorpi anti-JCV. Il paziente può avere precedentemente ricevuto una terapia anti-VLA-4, e in un altro caso, il paziente non ha precedentemente ricevuto una terapia anti-VLA-4.

5 Il paziente può essere classificato come candidato per la terapia anti-VLA-4 e una terapia anti-VLA-4, ad esempio, natalizumab, viene somministrata al paziente.

Se il paziente è classificato come candidato per la terapia anti-VLA-4, al paziente può essere ulteriormente somministrata una terapia anti-VLA-4. Un paziente classificato come candidato per la terapia anti-VLA-4 è determinato per avere un rischio più basso di sviluppare  
10 PML, ad esempio, un rischio inferiore a circa 0,2/1000 pazienti, ad esempio, 0,3/1000 pazienti o 0,2/1000 pazienti o 0,19/1000 pazienti o 0,11/1000 pazienti. Ad esempio, un paziente con un rischio inferiore di PML può avere un rischio  $\leq 0,2/1000$ .

Un paziente non classificato come candidato per la terapia anti-VLA-4, o determinato per essere un candidato per la terapia anti-VLA-4 con monitoraggio potenziato per lo sviluppo  
15 della PML, è determinato per avere un rischio più elevato di sviluppare PML, ad esempio, un rischio maggiore o uguale a circa 0,37/1000 pazienti. Ad esempio, un paziente determinato per avere un rischio più elevato di PML può avere un rischio di 0,37/1000, 0,35/1000, 0,66/1000, 1,2/1000, 1,37/1000, 2,5/1000, 4,3/1000 o 7,8/1000 pazienti.

Una precedente classificazione di esposizione a immunosoppressori, se selezionata, è  
20 una delle seguenti:

una precedente classificazione positiva dell'esposizione a immunosoppressori che corrisponde ad aver ricevuto una terapia immunosoppressiva non anti-VLA-4 entro un periodo di tempo preselezionato, ad esempio entro 1, 3 o 5 anni, o nel corso della vita del paziente; e

una precedente classificazione negativa dell'esposizione a immunosoppressori che  
25 corrisponde ad essere privo di una terapia immunosoppressiva non anti-VLA-4 per un periodo

di tempo preselezionato, ad esempio entro 1, 3 o 5 anni o nel corso della vita del paziente.

Una precedente classificazione dell'esposizione alla terapia VLA-4, se selezionata, è una delle seguenti:

una precedente classificazione positiva dell'esposizione alla terapia VLA-4 che  
5 corrisponde ad aver ricevuto una terapia anti-VLA-4 per più di un periodo di tempo preselezionato, ad esempio, quanto più o più di 1, 2, 3 o 5 anni; e

una precedente classificazione dell'esposizione alla terapia con VLA-4 che corrisponde ad aver ricevuto una terapia anti-VLA-4 per meno di un periodo di tempo preselezionato, ad esempio meno di 6 mesi, 1, 2, 3 o 5 anni

10 Una classificazione di idoneità al trattamento può essere selezionata da uno di:

una classificazione positiva di idoneità al trattamento correlata all'adeguatezza del paziente per il trattamento anti-VLA-4 (la classificazione positiva di idoneità al trattamento può essere ulteriormente suddivisa in classificazioni positive di idoneità al trattamento accompagnate da vari avvertimenti o requisiti per il monitoraggio, come un maggiore  
15 monitoraggio per lo sviluppo di PML); e

una classificazione negativa di idoneità al trattamento correlata all'inadeguatezza del paziente per il trattamento anti-VLA-4, o idoneità del paziente per il trattamento anti-VLA-4, accompagnata da vari avvertimenti o requisiti per un maggiore monitoraggio, come lo sviluppo della PML.

20 Una classificazione positiva di idoneità al trattamento è correlata a un minor rischio di sviluppare la PML e una classificazione negativa di idoneità al trattamento è correlata a un rischio più elevato di sviluppare la PML. Un rischio più basso di sviluppare PML corrisponde tipicamente a un rischio inferiore a 0,2/1000 pazienti, e un rischio più elevato di sviluppare PML corrisponde a un rischio di  $\geq 0,37/1000$ .

25 Se al paziente viene assegnata una classificazione a bassa esposizione e una

  
Ing. Ines Sangiacomo  
Consulente in F.I. n° USBM-041R

classificazione negativa dello stato JC, al paziente viene assegnata una classificazione positiva di idoneità al trattamento, ad esempio una classificazione positiva di idoneità al trattamento modificata che consiglia o richiede monitoraggio per lo sviluppo di PML.

5 Se al paziente viene assegnata una precedente classificazione negativa di esposizione immunosoppressiva e una classificazione negativa di stato anticorpale anti-JC, al paziente può essere assegnata una classificazione positiva di idoneità al trattamento, ad esempio una classificazione positiva di idoneità al trattamento modificata che consiglia o richiede monitoraggio per sviluppo di PML.

10 Se al paziente viene assegnata una classificazione di bassa esposizione, una precedente classificazione negativa di esposizione immunosoppressiva e una classificazione negativa anticorpale contro JCV, al paziente viene assegnata una classificazione positiva di idoneità al trattamento.

Se al paziente viene assegnata una classificazione positiva di idoneità al trattamento e al paziente può essere inoltre somministrata una terapia anti-VLA-4, ad esempio natalizumab.

15 Il test per la presenza di anticorpi anti-JCV è un test ELISA. Un saggio per l'acido nucleico di JCV può essere, ad esempio, un saggio PCR o un metodo NGS (Next Generation Sequencing).

20 A un paziente determinato per essere a basso rischio di PML può inoltre essere somministrata una terapia anti-VLA-4, come il natalizumab. A un paziente determinato ad essere a più alto rischio di PML può inoltre essere somministrata una terapia alternativa ad anti-VLA-4, come un interferone, glatiramer acetato, un corticosteroide o un agonista di TNF. A un paziente determinato per essere a più alto rischio per PML può essere ulteriormente somministrata una terapia anti-VLA-4 e può essere richiesto di essere sottoposto a test per PML con maggiore frequenza, e anche laddove inizialmente il paziente sia determinato per essere  
25 negativo a JCV, può essere richiesta una maggiore frequenza di test per JCV.

Il trattamento può includere ad esempio, la determinazione dell'esposizione precedente del paziente a una terapia anti-VLA-4 e la determinazione se il paziente abbia precedentemente ricevuto un trattamento con un immunosoppressore. Facoltativamente, è possibile determinare anche lo stato del paziente per JCV.

5           Se si ritiene che il paziente abbia ricevuto la terapia anti-VLA-4 per 24 mesi o meno e non abbia precedentemente ricevuto un trattamento con un immunosoppressore, il paziente è determinato per avere un rischio inferiore per PML e al paziente viene somministrata la terapia anti-VLA-4. Se il paziente è determinato per aver ricevuto natalizumab per più di 24 mesi (ad esempio, 25 mesi o più) e non aver ricevuto precedentemente un trattamento con un  
10 immunosoppressore, il paziente è determinato essere a più alto rischio di PML e il paziente viene somministrata un'alternativa alla terapia anti-VLA-4, ad esempio un interferone, un corticosteroide, una statina o un antagonista di TNF.

La determinazione dell'esposizione precedente del paziente a una terapia anti-VLA-4 o ad un immunosoppressore può includere chiedere al paziente o ad un caregiver, ad esempio, un  
15 medico, un infermiere, un genitore o altro caregiver. In alcuni casi, determinare l'esposizione preventiva del paziente può includere l'accesso alle informazioni in un database, ad esempio un database di cartelle cliniche.

Un metodo per determinare il rischio di un paziente di PML comprende la determinazione dell'esposizione precedente del paziente a una terapia anti-VLA-4 e la  
20 determinazione se il paziente abbia precedentemente ricevuto un trattamento con un immunosoppressore. Opzionalmente, può anche essere determinato lo stato anticorpale anti-JCV del paziente. Se si ritiene che il paziente abbia ricevuto una terapia anti-VLA-4 per 24 mesi o meno e non abbia precedentemente ricevuto un trattamento con un immunosoppressore, il paziente è determinato per avere un rischio inferiore di PML. Se il paziente è determinato avere  
25 ricevuto una terapia anti-VLA-4 per più di 24 mesi e non aver ricevuto precedentemente un

trattamento con un immunosoppressore, allora il paziente è determinato avere un rischio più elevato di PML. A un paziente determinato essere a basso rischio di PML può inoltre essere somministrata una terapia anti-VLA-4, ad esempio, natalizumab. Viceversa, a un paziente determinato essere a più alto rischio di PML può inoltre essere somministrata un'alternativa alla  
5 terapia anti-VLA-4, ad esempio un interferone, un corticosteroide, una statina o un antagonista del TNF.

Può essere determinato anche lo stato JCV del paziente, e se il paziente è determinato essere negativo a JCV, allora il paziente è determinato avere un rischio inferiore per PML rispetto a se il paziente è stato determinato come positivo a JCV.

10 Salvo diversa definizione, tutti i termini tecnici e scientifici qui usati hanno lo stesso significato comunemente inteso da un esperto nel ramo a cui appartiene la presente descrizione, compresa la presente invenzione. Sebbene metodi e materiali simili o equivalenti a quelli qui descritti possano essere usati nella pratica o nella prova della presente descrizione, inclusa la presente invenzione, metodi e materiali adatti sono descritti di seguito. In caso di conflitto, la  
15 presente specifica, comprese le definizioni, prevarrà. Inoltre, i materiali, i metodi e gli esempi sono solo illustrativi e non intendono essere limitanti.

I dettagli di una o più forme di realizzazione dell'invenzione sono riportati nei disegni allegati e nella descrizione seguente. Altre caratteristiche, oggetti e vantaggi dell'invenzione risulteranno evidenti dalla descrizione e dai disegni e dalle rivendicazioni.

## 20 **BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI**

Le Figure 1A e 1B sono grafici che descrivono l'incidenza di PML associata a natalizumab per durata cumulativa di trattamento (figura 1A) e per intervallo di trattamento di 12 mesi (figura 1B).

La Figura 2 è un diagramma schematico che illustra l'incidenza approssimativa di PML  
25 stratificata mediante l'uso precedente di immunosoppressori e la durata del trattamento con

  
Ing. Ines Sangiacomo  
Consulente in F.I. n° USBM-041R

natalizumab.

La Figura 3 è un diagramma schematico che illustra l'incidenza approssimativa di PML stratificata per stato anticorpale anti-JCV, precedente uso di immunosoppressori e durata del trattamento con natalizumab.

5 Le Figure 4A e 4B sono grafici che descrivono l'analisi di sensibilità delle stime di incidenza di PML in pazienti positivi agli anticorpi anti-JCV, stratificati mediante uso precedente di immunosoppressori (sì o no) e durata del trattamento con natalizumab [da 1 a 24 mesi (Figura 4A) o 25-48 mesi (Figura 4B)]. Base = Scenario di caso base.

10 Le Figure 5A e 5B sono grafici che descrivono nOD e titoli, rispettivamente, del paziente 1.

Le Figure 6A e 6B sono grafici che descrivono nOD e titoli, rispettivamente, del paziente 2.

Le Figure 7A e 7B sono grafici che descrivono nOD e titoli, rispettivamente, del paziente 3.

15 Le Figure 8A e 8B sono grafici che descrivono nOD e titoli, rispettivamente, del paziente 4.

Le Figure 9A e 9B sono grafici che descrivono nOD e titoli, rispettivamente, del paziente 5.

20 Le Figure 9C e 9D sono grafici che descrivono nOD e titoli, rispettivamente, del paziente 6.

Le Figure 10A e 10B sono grafici che descrivono nOD e titoli, rispettivamente, del paziente 7.

La Figura 11 è un grafico a dispersione che mostra l'indice (asse x) e l'inibizione percentuale (asse y) dei dati raccolti per un gruppo di pazienti con SM.

25 La Figura 12 è un grafico a dispersione che mostra l'indice (asse x) e l'inibizione

percentuale (asse y) dei dati raccolti per un gruppo di pazienti con SM.

La Figura 13 è un grafico a dispersione che mostra valori di indice determinati per un gruppo di pazienti con SM.

#### **DESCRIZIONE DETTAGLIATA**

5 L'invenzione si basa, almeno in parte, sulla scoperta di metodi nuovi e migliorati di valutazione del rischio di un paziente per la PML che includono la valutazione dei titoli anticorpali anti-JCV o l'inibizione percentuale. L'invenzione si basa almeno in parte sulla scoperta che il titolo anticorpale anti-JCV e l'inibizione anticorpale per cento possono essere un  
10 (PML).

I richiedenti hanno anche sviluppato un saggio ottimizzato per determinare i livelli del titolo anticorpale anti-JCV in un campione biologico e un metodo per testare gli anticorpi qualitativamente determinando i valori di inibizione percentuale e utilizzando queste informazioni per determinare il rischio di un paziente per lo sviluppo PML. Il saggio include:  
15 (a) formare una prima miscela di reazione comprendente una prima aliquota di un campione e un substrato su cui sono disposti HPVLP, dove le particelle VLP sono presenti ad una quantità di 0,04 µg e una concentrazione di 0,4 µg/ml; (b) rivelare il livello di anticorpo anti-JCV legato alla HPVLP disposta sul substrato, ad esempio rilevando un reagente di rilevazione secondario marcato, ad esempio un anticorpo anti-IgG marcato con enzima, legato all'anticorpo anti-JCV  
20 legato a detto substrato; (c) formare una seconda miscela di reazione comprendente una seconda aliquota di campione con HPVLP in fase di soluzione fornita ad una concentrazione di, ad esempio, 0,4 µg/ml e una seconda aliquota di campione fornita ad esempio a 1:100 o 1:101, diluizione; (d) formare una terza miscela di reazione comprendente una soluzione di controllo negativa che non contiene HPVLP e una terza aliquota di campione diluita, ad esempio 1:100 o  
25 1:101, o 1:110 nella soluzione di controllo negativa; (e) rilevare il livello di anticorpo anti-JCV

non legato nella seconda e nella terza miscela di reazione, ad esempio rilevando JCV in grado di legare un substrato su cui sono disposti HPVLP, dove è presente HPVLP; (f) fornire un primo valore, che corrisponde al livello di anticorpo anti-JCV legante HPVLP disposta sul substrato nella prima aliquota del campione e un secondo valore, che corrisponde al livello di anticorpo anti-JCV non legato nel secondo miscela di reazione, ad esempio l'anticorpo anti-JCV di livello  
5 che si lega a HPVLP disposto su un substrato da detta seconda miscela di reazione; e (g) facoltativamente, confrontando il primo e il secondo livello di anticorpi.

I richiedenti hanno anche scoperto che un paziente ha un rischio più basso di sviluppare PML se, (i) il titolo anticorpale anti-JCV come indicato dal valore dell'indice o nOD è  
10 determinato a  $<0,5$  o (ii) l'anti-JCV il titolo anticorpale come indicato dal valore dell'indice o dal numero ANOD è determinato per essere  $> 0,5$  e  $<3,0$  e l'inibizione percentuale è determinata per essere inferiore o uguale al 70%. Il paziente ha un rischio più elevato di PML se, (i) il titolo anticorpale anti-JCV come indicato dal valore dell'indice o nOD è determinato per essere  $> 3$  e il valore di inibizione percentuale è determinato per essere  $> 70\%$ , o (ii) il paziente ha mostrato un  
15 aumento dell'indice, del NOD o del titolo di 2 volte rispetto a un test precedente.

Un paziente può essere monitorato a intervalli regolari, ad esempio ogni 6 mesi o ogni 12 mesi per una variazione del titolo anticorpale anti-JCV o dell'inibizione percentuale. Se i risultati di questo saggio successivo indicano che il paziente ha ancora un titolo anticorpale anti-JCV di nOD inferiore a 0,5 e un'inibizione percentuale di  $<70\%$ , allora il paziente può essere  
20 determinato avere ancora un rischio inferiore per lo sviluppo di PML. Se un'analisi successiva indica che il titolo anticorpale del paziente è aumentato di 2-3 volte rispetto al dosaggio iniziale, è possibile determinare che il paziente presenta un rischio aumentato o superiore di sviluppare la PML. I richiedenti hanno osservato che pazienti con diagnosi di PML tendono a mostrare un aumento del titolo anticorpale e del nOD di 2-3 volte nei sei mesi precedenti la diagnosi.

25 Un paziente ha un rischio più elevato di PML se, (i) il titolo anticorpale anti-JCV come

indicato dal valore dell'indice o nOD è determinato per essere > 3 e il valore di inibizione percentuale è determinato per essere > 70%, o (ii) il paziente ha mostrato un aumento dell'indice, del NOD o del titolo di 2 volte rispetto a un test precedente.

Un paziente che soddisfa questi criteri può, facoltativamente, essere determinato per non essere un candidato a ricevere una terapia con una terapia anti-VLA-4, come un anticorpo anti-VLA-4, ad esempio, natalizumab, o il paziente può essere valutato per altri fattori di rischio di sviluppo di PML. Questi fattori di rischio includono se il paziente ha precedentemente ricevuto una terapia anti-VLA-4, come natalizumab, e per quanto tempo il paziente ha ricevuto la terapia; e se e per quanto tempo il paziente ha precedentemente ricevuto una terapia immunosoppressiva diversa da una terapia anti-VLA-4. Il rischio di PML di un paziente è una combinazione di ciascuno di questi fattori.

Il titolo anticorpale viene misurato nel presente contesto con "nOD" o "indice". "nOD" è il valore di densità ottica normalizzato in un test, come un test ELISA, per il rilevamento di anticorpi anti-JCV.

I richiedenti hanno scoperto in precedenza che i pazienti che hanno ricevuto una terapia anti-VLA-4, come natalizumab, per 24 mesi o meno, e che non hanno precedentemente ricevuto una terapia immunosoppressiva, hanno un rischio più basso di sviluppare PML, rispetto ai pazienti che fanno non soddisfare questi due criteri. Inoltre, i pazienti che presentano il rischio più basso sono quelli che soddisfano questi due criteri e che sono anche negativi al JCV, ad esempio, i pazienti che non risultano positivi agli anticorpi anti-JCV o all'acido nucleico di JCV, ad esempio JCV DNA. Era precedentemente sconosciuto che ciascuno di questi tre fattori di rischio (i) la quantità di tempo in cui il paziente ha precedentemente ricevuto una terapia anti-VLA-4, (ii) indipendentemente dal fatto che un paziente abbia precedentemente ricevuto un trattamento con un immunosoppressore diverso da una terapia anti-VLA-4 e (iii) stato di JCV) contribuiscono in modo indipendente al rischio di PML di un paziente. Le invenzioni qui

descritte possono essere usate in generale per pazienti trattati con un inibitore VLA-4. La capacità di identificare sottopopolazioni di pazienti con rischi di PML distintamente diversi consente una migliore caratterizzazione del rischio rispetto ai metodi precedenti (vale a dire, il rischio complessivo di PML) e dovrebbe aiutare gli operatori sanitari e i pazienti a prendere

5 decisioni più informate sul trattamento dei rischi. Questi criteri di valutazione del rischio sono descritti nelle domande provvisorie statunitensi in co-proprietà 61/491,810, depositata il 31 maggio 2011 e 61/508584, depositata il 15 luglio 2011. I criteri di rischio descritti nel presente documento diretti al titolo anticorpale anti-JCV (ad esempio, misurato dal livello nOD o indice) e l'inibizione percentuale possono essere considerati in combinazione con i fattori di rischio

10 descritti nelle precedenti applicazioni provvisorie di comproprietà.

I metodi per determinare il rischio di PML possono richiedere l'acquisizione di uno, due o tutti e tre di una classificazione JCV per un paziente (ad esempio, titolo anticorpale anti-JCV, come misurato da nOD o livello indice e percentuale di inibizione), precedenti anamnesi di terapia anti-VLA-4 per il paziente e precedenti anamnesi di terapia immunosoppressiva (diversa

15 dalla terapia anti-VLA-4) per il paziente. Coerentemente a queste classificazioni, a un paziente può essere assegnata una classificazione di idoneità al trattamento. Ai pazienti che sono determinati avere un basso rischio di sviluppare PML può essere assegnata una classificazione di trattamento positiva e ai pazienti che sono determinati avere un rischio relativo più elevato di sviluppare PML può essere assegnata una classificazione di trattamento negativa. Un paziente

20 che riceve una classificazione di trattamento positiva può ricevere una raccomandazione per un ulteriore trattamento o per iniziare il trattamento con una terapia anti-VLA-4. Un paziente che riceve una classificazione di trattamento negativa può ricevere una raccomandazione per interrompere il trattamento con un anti-VLA-4, una raccomandazione per iniziare il trattamento con una terapia non anti-VLA-4, una raccomandazione per continuare o iniziare la terapia anti-

25 VLA4 con maggiore sorveglianza per segni e sintomi di PML.

Una raccomandazione per un ulteriore trattamento con una terapia anti-VLA-4 può essere accompagnata da ulteriori istruzioni o requisiti che il paziente riceve un monitoraggio aggiuntivo o potenziato, ad esempio se uno o più fattori indicano che il paziente potrebbe essere a maggior rischio di PML, ad esempio precedente trattamento con una terapia anti-VLA-4 per un periodo superiore a 24 mesi, ad esempio 25 mesi o più, o precedente trattamento con un immunosoppressore diverso da una terapia anti-VLA-4.

Si può stabilire che un paziente abbia precedentemente ricevuto una terapia anti-VLA-4 o una terapia immunosoppressiva diversa da una terapia anti-VLA-4 attraverso l'auto-segnalazione del paziente, o attraverso informazioni (verbali o scritte) fornite da un genitore, un medico, un assistente medico, un infermiere o altro operatore sanitario. Le informazioni possono anche essere ottenute attraverso un database, come un database medico o un database di studi clinici.

Le precedenti terapie immunosoppressive, diverse dalla terapia anti-VLA-4, che indicheranno un aumento del rischio di PML possono includere un precedente trattamento con antineoplastici, immunosoppressori o immunomodulatori, come uno o più interferone beta o glatiramer acetato. Immunosoppressori esemplificativi includono, ad esempio, mitoxantrone, metotrexato, azatioprina, ciclofosfamide e micofenolato, terapia anti-CD20 (ad esempio, rituximab), una terapia anti-CD11a (ad esempio, efalizumab) o micofenolato mofetile. Il precedente trattamento con altre terapie immunosoppressive come descritto di seguito sarà anche previsto per aumentare il rischio di PML di un paziente dopo ulteriore somministrazione di una terapia anti-VLA-4. In generale, una determinazione del precedente uso di immunosoppressori è un uso specifico che può essere un qualsiasi uso precedente di un immunosoppressore che non è un inibitore del VLA-4 (ad esempio un anticorpo anti-VLA-4) o un precedente uso entro un determinato periodo di tempo, ad esempio, nei precedenti 1, 2, 3, 5 o 10 anni prima della valutazione del rischio di PML.

Gli anticorpi a JCV sono rilevati mediante saggio ELISA. In una forma di realizzazione, gli anticorpi contro JCV possono essere rilevati mediante il metodo descritto nella domanda internazionale di brevetto PCT/US2011/20832, che utilizza HPVLP in condizioni adatte per il legame di un anticorpo anti-JCV per il rilevamento del livello di legame dell'anticorpo anti-JCV  
5 in un campione biologico. I metodi per determinare lo stato di JCV includono anche i metodi per determinare il titolo anticorpale anti-JCV e l'inibizione percentuale. Il rilevamento del titolo anticorpale anti-JCV e l'inibizione percentuale includono tipicamente un test di rilevazione anticorpale in due fasi come descritto nel numero di domanda internazionale PCT/US2011/20832.

10 Se la presenza di JCV è identificata in un campione biologico da un paziente, ad esempio anticorpi contro JCV, proteine, peptidi o acidi nucleici, il paziente è determinato ad essere "JCV positivo". Una classificazione JCV positiva corrisponde alla presenza di anticorpi contro JCV nel campione biologico, ad esempio anticorpi contro JCV che sono uguali o maggiori di un criterio preselezionato. Il criterio preselezionato è tipicamente un valore  
15 qualitativo, ad esempio una quantità "rilevabile" di anticorpo secondo un particolare saggio, ad esempio un test immunologico.

I metodi qui descritti per determinare il rischio di PML possono essere utili per qualsiasi soggetto umano, incluso un soggetto che considera il trattamento con un immunomodulatore, ad esempio una terapia anti-VLA-4 (ad esempio, natalizumab), una terapia anti-CD20 (ad esempio, rituximab), una terapia anti-CD11a (ad esempio, efalizumab) o micofenolato mofetile; in un  
20 soggetto attualmente trattato con un immunomodulatore; o un soggetto che ha cessato il trattamento con un immunomodulatore. Il metodo può essere utile per gli altri che potrebbero essere suscettibili alla PML, come individui con disordini linfoproliferativi, come mieloma multiplo o linfoma; individui infettati da virus dell'immunodeficienza umana (HIV), o che  
25 hanno acquisito la sindrome da immunodeficienza (AIDS), neoplasie ematologiche o una

malattia autoimmune come lupus eritematoso sistemico (LES), una malattia infiammatoria intestinale, come la malattia di Crohn (CD) o ulcerativa colite, sclerosi multipla (SM) o artrite, ad esempio artrite reumatoide (RA). Il metodo di valutazione del rischio può anche essere utile ai soggetti che ricevono terapie immunosoppressive o immunomodulatorie, come i pazienti sottoposti a trapianto. Terapie immunosoppressive o immunomodulatorie esemplificative includono natalizumab, rituximab, efalizumab e micofenolato mofetile. Il metodo può essere utile per valutare il rischio in un soggetto affetto da disturbo o trattato con un farmaco, divulgato in Piccinni et al. "Stronger association of drug-induced progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) with biological immunomodulating agents" *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 66:199-206,2010.

#### *Definizioni*

Come qui utilizzato, una "HPVLP" è una VLP altamente purificata ("particella simile a virus") costituita prevalentemente dalla proteina VP1. Una "HPVLP" descritta nell'invenzione è composta principalmente dalla principale proteina capside "VP1", che può essere VP1 o VP1 ricombinante, dal polyomavirus, JC Virus (JCV). Una HPVLP può essere composta, ad esempio, da almeno una subunità pentamerica, più di una subunità pentamerica, fino a settantadue subunità pentameriche o più VP1. Una HPVLP dell'invenzione può legare gli anticorpi contro il virus JC intatto, presente in natura. In alcune forme di realizzazione, una HPVLP include un secondo e facoltativamente un terzo polipeptide che è una proteina capside minore del virus JC, ad esempio, almeno un polipeptide VP2 o VP3. VP2 o VP3 possono essere polipeptidi ricombinanti o presenti in natura o derivati di origine naturale.

Tali particelle "altamente purificate" contengono più di un pentamero VP1, ad esempio almeno 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 72 pentameri VP1, o meno di 100 pentameri VP1. Tali particelle altamente purificate possono essere ottenute, ad esempio, mediante un metodo che comporta una doppia filtrazione. Ad esempio, in una forma di realizzazione, una preparazione

  
Ing. Ines Sangiacomo  
Consulente in F.I. n° USBM-041R

altamente purificata di VLP viene ottenuta purificando le particelle almeno due volte mediante centrifugazione, ad esempio attraverso un cuscino di saccarosio. In altre forme di realizzazione, gli HPVLP vengono preparati utilizzando metodi cromatografici. In generale, una preparazione HPVLP può essere identificata dalla sua attività in un test ELISA utilizzando campioni di controllo definiti. In alcuni casi, tali campioni di controllo sono controlli negativi e/o campioni di controllo contenenti bassi livelli di anticorpi contro JCV.

Come qui utilizzato, un “substrato HPVLP ad alto rapporto segnale/rumore” è un substrato su cui è disposta HPVLP. Può essere utilizzato per valutare il livello di libero (cioè non legato all'antigene o ad altro target, ad esempio, HPVLP, in un campione. La concentrazione di HPVLP sul substrato è tale che, quando si misura la quantità di anticorpo anti-JCV presente, fornisce un rapporto segnale-rumore da 10 a 30, da 15 a 30, da 15 a 25, da 18 a 22. In una forma di realizzazione il rapporto segnale/rumore è almeno 10, 15, 18 o 20. In forme di realizzazione il rapporto segnale/rumore è di circa 10, 15, 18 o 20. Il rapporto segnale/rumore può essere determinato con un campione, ad esempio un controllo di calibrazione, che fornisce una densità ottica di 1,0. In una forma di realizzazione la HPVLP è fornita su detto substrato ad una concentrazione che risulta dalla liofilizzazione di 0,5 ml, 0,8 ml, 1,0 ml, 1,2 ml, o 1,5 ml di 0,4 µg/ml di HPVLP in un pozzetto di una piastra da 96 pozzetti. In una forma di realizzazione la HPVLP è fornita su detto substrato ad una concentrazione che risulta dalla liofilizzazione di 1,0 ml di 0,4 µg/ml di HPVLP in un pozzetto di una piastra a 96 pozzetti, che come qui usata è equivalente a 30 ng a 50 ng (ad esempio, 40 ng) HPVLP per pozzetto. In una forma di realizzazione l'HPVLP è fornito su detto substrato ad una concentrazione che risulta dalla liofilizzazione di 0,05 ml a 0,35 ml o da 0,1 ml a 0,2 ml di 0,4 µg/ml di HPVLP in un pozzetto di una piastra da 96 pozzetti. La quantità di HPVLP disposta sul substrato, o le condizioni in cui si ottiene la deposizione, può variare fino a quando si ottiene il rapporto segnale-rumore desiderato.

Un rapporto segnale-rumore viene calcolato confrontando il valore di densità ottica del controllo negativo con il controllo del calibratore per determinare il range dinamico dell'intensità del segnale nel test.

In una forma di realizzazione il campione viene diluito a circa 100 volte e il taglio per il  
5 punteggio negativo è una riduzione che è inferiore o uguale al 45% e, il taglio per un punteggio  
positivo è maggiore del 45%. Nelle forme di realizzazione la diluizione è diversa da 100 volte  
ma è inferiore a 200 volte. Ad esempio, la diluizione è compresa tra 50 e 150 volte, 75 e 125  
volte, 85 e 115 volte. Nelle forme di realizzazione, la diluizione è inferiore a 150 volte, 125  
volte, 100 volte o 75 volte. In forme di realizzazione in cui la diluizione è diversa da 100 volte  
10 (ad esempio 200 volte 400 volte, 500 volte, 800 volte, fino a > 1.000.000 di volte, il valore limite  
o altri parametri sono regolati in modo tale che un campione possa ricevere lo stesso punteggio  
(positivo o negativo) di quello che avrebbe se la diluizione fosse 100 volte e il cut-off per il  
negativo è inferiore al 45% e il cut off per il positivo è maggiore o uguale al 45%.

*Saggio di rilevamento dell'anticorpo anti-JCV.* Le analisi vengono condotte  
15 aggiungendo un campione biologico a un substrato rivestito con un HPVLP e rilevato  
utilizzando metodi noti nell'arte. In generale, viene utilizzata una piattaforma di base solida  
come una piastra per microtitolazione (ad esempio una piastra a 96 pozzetti); sebbene possano  
essere utilizzati altri formati noti nell'arte. In alcune forme di realizzazione, il campione  
biologico viene diluito prima dell'uso in un saggio.

20 Il formato del saggio è un saggio immunologico a legame enzimatico (ELISA). In  
generale, il metodo include tipicamente il rivestimento del substrato con antigene di cattura  
come HPVLP, campione di incubazione contenente anticorpi leganti diretti a catturare il  
reagente, lavaggio per rimuovere specie non specificamente legate e rilevamento dei complessi  
immuni legati, ad esempio, mediante un dosaggio cromogenico o chemiluminescente. I substrati  
25 cromogeni producono un prodotto finale colorato, che può essere rilevato e misurato

visivamente o con l'uso di uno spettrofotometro. I substrati chemiluminescenti producono luce, che può essere misurata usando un luminometro.

Il rivestimento di una piastra con HPVLP comprende generalmente l'incubazione del substrato solido (come i pozzetti di una piastra per microtitolazione) con una soluzione di HPVLP ad una concentrazione adeguata (ad esempio, 0,4 µg/ml), durante la notte o per un numero specificato di ore. HPVLP può includere VP1 come l'unico componente virale JCV, o l'HPVLP può essere una particella eterologa, che contiene almeno uno di VP2 o VP3 per particella o almeno uno ciascuno di VP2 e VP3 per particella. Dopo il rivestimento con HPVLP, i pozzetti della piastra vengono lavati. Il substrato viene quindi "rivestito" con una proteina non specifica che è antigenicamente neutra rispetto ai campioni da testare. Materiali di rivestimento adatti sono noti nella tecnica e comprendono albumina di siero bovino (BSA), caseina, zuccheri o soluzioni di latte in polvere. Le piastre possono quindi essere asciugate e conservate per un periodo di tempo più lungo, ad esempio 1 giorno, 1 mese o 1 anno prima di procedere alla fase successiva del test.

Il campione o il riferimento viene incubato sul substrato preparato in condizioni efficaci per consentire la formazione di complessi (anticorpo HPVLP/JCV), formando così un complesso legato. La rilevazione del complesso legato viene eseguita utilizzando un anticorpo marcato che può legarsi all'anticorpo umano. In generale, l'anticorpo marcato può rilevare IgG umane o IgG umane e IgM. In alcuni casi, il dosaggio può essere eseguito utilizzando metodi di rilevamento secondario o terziario.

Un campione di riferimento può essere dello stesso materiale biologico (ad esempio, plasma, siero, urina o liquido cerebrospinale) isolato da un individuo noto per essere affetto dal virus JC in base alla presenza di DNA di JCV nelle urine dell'individuo (uropositivo). Un campione di riferimento viene utilizzato per stabilire il punto di divisione del test in modo tale che il tasso di falsi negativi del test non sia maggiore dell'1% -3%.

“In condizioni efficaci per consentire la formazione di complessi” indica generalmente le condizioni in cui i reagenti sono stati diluiti per ridurre lo sfondo e fornire letture dei risultati che si trovano entro un intervallo specificato. I diluenti possono includere, in esempi non limitativi, soluzioni che includono BSA, soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) o PBS  
5 contenente Tween.

Le condizioni “idonee” includono anche condizioni che sono a temperatura e/o per un periodo di tempo sufficiente a consentire un legame efficace. Le incubazioni sono tipicamente da una a due ore o da una a quattro ore, a temperature di circa 25 °C a 27 °C, o possono essere durante la notte a circa 4 °C. Tuttavia, quelli del ramo comprenderanno che altre condizioni  
10 potrebbero essere adatte.

In generale, uno o più lavaggi vengono condotti tra le incubazioni del dosaggio. Soluzioni di lavaggio appropriate includono tampone diluente (ad esempio, PBS o PBS/Tween) o tampone borato.

In generale, il rilevamento dell'anticorpo legato all'HPVLP viene eseguito utilizzando  
15 metodi ben noti nell'arte. In generale, tali metodi si basano sulla rilevazione di un'etichetta o di un marker, come un tag radioattivo, fluorescente, biologico o enzimatico. I brevetti statunitensi riguardanti l'uso di tali etichette includono, ad esempio, brevetti USA nn. 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149 e 4,366,241. In generale, il rilevamento del legame degli anticorpi anti-JCV viene rilevato usando un anticorpo secondario etichettato. In generale,  
20 l'anticorpo secondario è specifico per la rilevazione di IgG umane. La quantificazione si ottiene misurando il grado di colore generato, ad esempio utilizzando uno spettrofotometro di spettri visibili.

In una forma di realizzazione, il test viene eseguito in uno studio medico, ad esempio da un operatore sanitario, ad esempio un medico, un infermiere o un tecnico, che lavora in una  
25 struttura in cui il campione biologico è ottenuto da un paziente. In un'altra forma di

realizzazione, il campione biologico ottenuto da un paziente viene trasportato in un'altra struttura, ad esempio una struttura terza, dove viene eseguito il saggio. In quest'ultimo caso, i risultati dell'analisi possono essere segnalati al fornitore di assistenza sanitaria, ad esempio tramite un modulo, che può essere inviato per posta o per via elettronica (ad esempio, tramite fax o e-mail) o tramite un database on-line. In una forma di realizzazione, i risultati del test (compreso il test di screening e, facoltativamente, un test di conferma) possono essere memorizzati in un database e possono essere consultati da un operatore sanitario, ad esempio attraverso il web mondiale.

*Test secondario.* In alcuni casi, ad esempio, quando il livello di anticorpo anti-JCV in un campione cade in una "zona equivoca" o "zona indeterminata" designata, ad esempio, dove viene determinato che vi è una certezza limitata riguardo alla presenza o assenza di anticorpo anti-JCV (come quando il valore del nOD è determinato essere  $> 0,2$  e  $< 0,4$ ), viene impiegato un test secondario (qui indicato anche come "test di conferma") del campione. Per il test secondario vengono utilizzate due aliquote di un campione biologico. Il primo viene preparato prima dell'uso nel saggio preincubando il campione in presenza di tampone di analisi in soluzione per un periodo di tempo (ad esempio, per 30 minuti, un'ora o più, ad esempio durante la notte a 4 °C). La seconda aliquota viene preparata prima dell'uso nel saggio preincubando il campione in presenza di HPVLP in soluzione per un periodo di tempo (ad esempio, per 30 minuti o un'ora o più). Le due aliquote vengono quindi utilizzate nell'analisi HPVLP come descritto qui e l'assegnazione del campione all'anticorpo anti-JCV positivo o all'anticorpo negativo viene effettuata. Se i risultati del test per l'aliquota incubata con HPVLP indicano un valore di  $< 45\%$  di inibizione (vale a dire, il "punto di soglia"), il campione viene interpretato come negativo per la presenza di anticorpi specifici JCV. Se i risultati del test indicano un valore di inibizione  $\geq 45\%$ , il campione viene interpretato come anticorpi specifici per JCV e quindi come anticorpo positivo.

Un saggio descritto nell'invenzione che utilizza un test secondario viene anche qui indicato come "test in due fasi" o "dosaggio in due fasi". Una versione precedente del dosaggio in due fasi è descritta nella domanda internazionale di comproprietà PCT/US2011/020832.

*Substrati e metodi basati su soluzioni.* Qualsiasi substrato solido adatto può essere  
5 utilizzato per il formato del dosaggio HPVLP. In alcune forme di realizzazione, il substrato è una piastra per microtitolazione (ad esempio una piastra da 96 pozzetti) una diapositiva, una perlina o una colonna. Il substrato può essere adatto per metodi di rilevazione cromogenici o chemiluminescenti o metodi basati su soluzioni come la legatura prossimale.

*Punto di soglia.* L'invenzione fornisce metodi di analisi che impiegano "punti di soglia"  
10 per ridurre i tassi di falsi negativi e falsi positivi. I punti di soglia sono stabiliti sulla base dei dati dei saggi HPVLP (ad esempio, per rilevare anticorpi contro JCV in un campione biologico), in media, ad esempio, tra campioni di prova duplicati e repliche multiple (ad esempio, almeno due, almeno quattro o almeno otto repliche di campioni di controllo). I punti di cut-off possono anche essere determinati statisticamente utilizzando grandi pannelli di campioni non PML e  
15 PML.

In una versione di un saggio secondo la presente invenzione, i risultati dei saggi di screening HPVLP iniziali, ad esempio i saggi ELISA, determineranno la classificazione di un campione come avente o meno anticorpi specifici JCV o, se il campione non rientra in una di queste due classificazioni, quindi il campione sarà sottoposto a un test di conferma  
20 supplementare. Ad esempio, i campioni che producono un risultato in un test ELISA HPVLP descritto nell'invenzione inferiore a un livello stabilito (ad esempio, un  $nOD_{450} < 0,2$ ) sono classificati come privi di anticorpi specifici JCV e campioni che forniscono un risultato nell'ELISA superiore a un livello stabilito (ad esempio, un  $nOD_{450} > 0,4$ ) sono classificati come positivo per gli anticorpi specifici per JCV. I campioni che non rientrano chiaramente in una di  
25 queste classificazioni (ad esempio,  $0,2 < OD_{450} < 0,4$ ) possono essere testati in un test di

conferma.

In una forma di realizzazione, il test di conferma richiede una fase di preincubazione, in cui il campione viene pre-incubato con un tampone (o altra soluzione adatta) o con HPVLP (in tampone o altra soluzione adatta) per pre-adsorbire JCV -anticorpi specifici prima dell'analisi in un test ELISA per HPVLP, come descritto in ulteriore dettaglio di seguito. Dopo la pre-  
5 incubazione con HPVLP se la reazione nel saggio primario diminuisce di meno del 45% rispetto al controllo tampone, il campione viene interpretato come negativo per la presenza di anticorpi specifici JCV. Se i risultati mostrano una riduzione della reazione  $\geq 45\%$  rispetto al controllo tampone nel test primario dopo la pre-incubazione con HPVLP, il campione viene interpretato  
10 come contenente anticorpi specifici JCV. In alcune forme di realizzazione, viene eseguita solo la prova di conferma.

*VP1*. L'uso di HPVLP in un dosaggio per anticorpi contro JCV può migliorare l'accuratezza del test ed è utile in un dosaggio adatto a scopi analitici e diagnostici. VP1 per l'uso nella produzione di HPVLP può essere generato utilizzando metodi noti nella tecnica e può  
15 essere VP1 o VP1 prodotto in modo ricombinante, ad esempio VP1 di un virus JC. In generale, il VP1 utilizzato è VP1 da un ceppo MAD1 di JCV. In alcune forme di realizzazione, il VP1 utilizzato nel saggio comprende VP1 da più di un ceppo JCV, ad esempio, da uno o più ceppi 1A, 1B, 2A, 2B, 3, 4 e 7. Dopo la preparazione di VP1, ad esempio VP1 ricombinante sintetizzato, il VP1 per l'uso nei saggi qui descritti viene poi ulteriormente purificato attraverso  
20 metodi biochimici standard comprendenti metodi di gradiente di densità/ultracentrifugazione, o una serie di fasi di precipitazione chimica, concentrazione/diafiltrazione e cromatografia a scambio ionico. I metodi di purificazione comprendono tipicamente un passaggio per rimuovere proteine più piccole compresi i polipeptidi di monomero VP1, o pentamero VP1. La rimozione di queste particelle più piccole può essere eseguita, ad esempio, in una fase o in due fasi (ad  
25 esempio, una prima fase di filtrazione per rimuovere i monomeri VP1, e quindi una seconda

fase di filtrazione per rimuovere le particelle di pentamero VP1). Tali metodi di purificazione biochimica sono noti agli esperti nell'arte. Gli esempi 1 e 7 forniscono due diversi metodi di purificazione JCV VP1-VLP.

Una preparazione HPVLP (HPVLP) secondo un aspetto della presente invenzione non  
5 contiene quantità significative di monomero VP1 (ad esempio, è stato purificato per rimuovere monomeri). Una preparazione HPVLP secondo un altro aspetto della presente invenzione non contiene quantità significative di molecole VP1 in configurazioni della dimensione di un pentamero VP1, o più piccole (incluso il monomero). L'HPVLP può essere preparato da VP1 ricombinante o VP1 presente in natura (ad esempio, isolato da virus o capsidi virale). In alcune  
10 forme di realizzazione, componenti JCV addizionali, come una o entrambe le proteine del rivestimento minore del virus JC, ad esempio VP2 o VP3, sono incluse nella particella HPVLP o sono associate al substrato.

In alcuni casi, VP1 ricombinante espresso non può essere assemblato in pentameri o HPVLP che assomigliano a capsidi virali presenti in natura, ad esempio, VP1 ricombinante  
15 espresso può assemblare in provette o altre geometrie non sferiche. Di conseguenza, l'invenzione riguarda metodi per produrre HPVLP che sono sostanzialmente di geometria sferica. L'invenzione include preparazioni HPVLP in cui almeno circa il 10%, circa il 15%, circa il 20%, circa il 25%, circa il 50%, circa il 60%, circa il 65%, circa il 70%, circa l'80%, circa il 90%, circa 95 %, o circa il 99% degli HPVLP presenti nella preparazione assomigliano  
20 al capsidi JCV naturale (ad esempio, sono in una configurazione icosaedrica o sostanzialmente sferica). In alcune forme di realizzazione, una preparazione HPVLP contiene almeno il 10%, almeno il 15%, almeno il 20%, almeno il 50%, almeno il 60%, almeno il 70%, almeno l'80%, almeno il 90%, almeno il 95% o almeno il 99% degli HPVLP presenti nella preparazione assomigliano al capsidi JCV presente in natura. Tali metodi possono includere esprimere  
25 proteine virali in condizioni che risultano in tale preparazione e/o isolare e purificare proteine

virali espresse come qui descritto per produrre tale preparazione.

*Metodi per produrre HPVLP.* HPVLP possono essere realizzate, ad esempio, trasformando un baculovirus con un vettore che esprime un gene VP1, come un gene VP1 da un virus JC. Il baculovirus è usato per infettare una coltura cellulare, come una coltura di cellule di insetto (ad esempio cellule SF9) o una coltura cellulare di mammifero, e le cellule esprimono la proteina VP1. Le HPVLP vengono isolate lisando le cellule e purificando le particelle attraverso una serie di fasi di centrifugazione e ultrafiltrazione. In generale, la purificazione viene eseguita utilizzando metodi come la sedimentazione del cuscino saccarosio, l'ultracentrifugazione isopicnica e l'ultrafiltrazione estesa o altri metodi noti agli esperti nell'arte. In alcune forme di realizzazione, la purificazione includerà due volte la centrifugazione le particelle attraverso un cuscino di saccarosio. In un metodo di purificazione alternativo, le cellule vengono lisate e le particelle vengono isolate mediante una serie di fasi di precipitazione e concentrazione/diafiltrazione con una fase di scambio ionico finale. In ancora un altro metodo alternativo, le HPVLP vengono purificate mediante metodi cromatografici e senza fasi di centrifugazione.

La purezza può essere valutata utilizzando qualsiasi tecnica adeguata nota nell'arte, ad esempio l'ultracentrifugazione analitica, la microscopia elettronica, l'analisi PAGE, la spettrometria di massa, la concentrazione di proteine o l'attività in un ELISA con sieri di controllo. VLP purificate in modo insufficiente producono un fondo elevato che produce livelli anticorpali anti-JCV falsamente elevati o tassi di esposizione calcolati.

In alcune forme di realizzazione le HPVLP contengono VP1 come unica proteina del virus JC.

In alcune forme di realizzazione, le HPVLP sono particelle eterogenee, e quindi includono la proteina VP1 e almeno una delle proteine minori del virus JC, ad esempio VP2 o VP3. In un'altra forma di realizzazione, HPVLP include le proteine VP1, VP2 e VP3. Una

HPVLP che include VP1 e VP2 può essere prodotta utilizzando metodi noti nell'arte, ad esempio trasformando un baculovirus con un acido nucleico comprendente un VP1 e un gene VP2, come sotto il controllo degli stessi o di diversi promotori. Una coltura cellulare è infettata dal baculovirus e le cellule esprimono VP1 e VP2 e si formano HPVLP che includono entrambi i tipi di proteine. In una forma di realizzazione, i geni VP1 e VP2 si trovano su diverse molecole di DNA, le molecole di DNA vengono trasformate in diversi baculovirus e i baculovirus vengono utilizzati per trasfettare le cellule nella stessa coltura. Le cellule esprimono le proteine VP1 e VP2 e si formano HPVLP che includono entrambi i tipi di proteina. In alcuni casi, una HPVLP eterogenea include, ad esempio, uno o due polipeptidi VP2 per ogni cinque polipeptidi VP1. In generale, una HPVLP contiene più polipeptidi VP1 rispetto ai polipeptidi VP2, come nel caso del virus JC presente in natura.

Una HPVLP che include sia VP1 che VP3 o entrambe le molecole VP1 e VP2 può essere prodotta, ad esempio, trasformando un baculovirus con un acido nucleico comprendente un VP1 e un gene VP3 o un gene VP1 e VP2, rispettivamente, sotto il controllo degli stessi o di diversi promotori. Una coltura cellulare è infettata da baculovirus e le cellule esprimono VP1 e VP3 o VP1 e VP2 e si formano HPVLP che includono entrambi i tipi di proteine. In alcune forme di realizzazione, i geni VP1 e VP3 o VP1 e VP2 si trovano su diverse molecole di DNA, le molecole di DNA sono trasformate in diversi baculovirus e i baculovirus vengono utilizzati per trasfettare le cellule nella stessa coltura. Le cellule esprimono le proteine VP1 e VP3 o VP1 e VP2, rispettivamente, e si formano HPVLP che includono entrambi i tipi di proteina. Le particelle di HPVLP possono essere isolate da tali preparazioni usando metodi noti nell'arte come quelli usati per isolare i capsidi di JCV.

Tipicamente, un pentamero VP1 che si trova in una HPVLP eterogenea include, ad esempio, cinque polipeptidi VP1 e un polipeptide VP3 e/o un polipeptide VP2, a seconda che sia stato utilizzato un gene VP3 o VP2 per costruire i costrutti. In una HPVLP ci sono

  
Ing. Ines Sangiacomo  
Consulente in F.I. n° USBM-041R

tipicamente più polipeptidi VP1 che polipeptidi VP3 o VP2. In alcune forme di realizzazione, VP2 o VP3 provengono da un polyomavirus che non è un virus JC, ad esempio un polipeptide virale BK.

Una HPVLP che include tutte e tre le molecole VP1 e VP2 e VP3 può essere prodotta trasformando un baculovirus con un acido nucleico (ad esempio un DNA circolare, ad esempio <5,5 kb) comprendente un gene VP1, VP2 e VP3, come sotto il controllo degli stessi o di diversi promotori. Una coltura cellulare, come una coltura cellulare di mammifero, è infettata dal baculovirus e le cellule esprimono le proteine VP1, VP2 e VP3. Si formano di conseguenza HPVLP che includono tutti e tre i tipi di proteine. In una forma di realizzazione, il VP1 e uno o entrambi i geni VP2 e VP3 sono su diverse molecole di DNA, le molecole di DNA vengono trasformate nello stesso o diverso baculovirus e il baculovirus viene utilizzato per infettare le cellule nelle stesse colture o in colture separate. Le cellule esprimono le proteine VP1, VP2 e VP3 e si formano HPVLP che includono entrambi i tipi di proteina. Una HPVLP eterogenea può includere, ad esempio, cinque polipeptidi VP1 e uno ciascuno dei polipeptidi VP2 e VP3, sebbene i rapporti possano variare all'interno di una preparazione. In una HPVLP ci sono tipicamente più polipeptidi VP1 che polipeptidi VP2 e VP3.

In alcune forme di realizzazione, la HPVLP ha una dimensione maggiore rispetto a un pentamero di VP1. Per dimensioni maggiori, si intende che la massa di proteina contenuta in una particella HPVLP è maggiore di un pentamero contenente esclusivamente VP1.

In altre forme di realizzazione, il metodo di preparazione di una soluzione di HPVLP può includere la rimozione dalle particelle di soluzione (ad esempio, monomeri VP1 o particelle contenenti VP1 piccole) che sono le dimensioni di un pentamero VP1 o inferiore. Metodi come la centrifugazione e la cromatografia di esclusione dimensionale possono essere utilizzati per eseguire questa fase di purificazione. In alcune forme di realizzazione, altri metodi noti nell'arte, ad esempio cromatografia a scambio ionico, possono essere utilizzati nella preparazione di

HPVLP che sono più grandi di un pentamero VP1. In generale, una preparazione HPVLP adatta per l'uso in un dosaggio contiene almeno il 20% di HPVLP, almeno il 25% di HPVLP, almeno il 40% di HPVLP, almeno il 60% di HPVLP, almeno il 65% di HPVLP, almeno il 70% di HPVLP, almeno l'80% di HPVLP, almeno l'85% di HPVLP, almeno il 90% di HPVLP, almeno il 95% di HPVLP o almeno il 99% di HPVLP rispetto alle particelle non HPVLP (ad esempio, in percentuale dei pentameri rispetto ai monomeri VP1 e agli aggregati contenenti meno di cinque molecole VP1).

*Metodi di valutazione di campioni e/o soggetti.* Come qui utilizzato, i metodi di valutazione o analisi di un soggetto o campione biologico di un soggetto includono uno o più dei risultati dell'analisi del campione, la richiesta di analisi del campione, la richiesta di risultati dall'analisi del campione o la ricezione dei risultati dall'analisi di il campione. (In generale, la determinazione (o determinazione), l'analisi o la valutazione (o la valutazione) possono includere uno o entrambi l'esecuzione del metodo sottostante o la ricezione di dati da un altro che ha eseguito il metodo sottostante.)

L'analisi o la valutazione richiede una trasformazione di materiale, ad esempio materiale biologico o componenti del dosaggio. Ad esempio, un campione biologico può essere valutato per la presenza di anticorpi anti-JCV, titolo anticorpale anti-JCV e inibizione percentuale degli anticorpi contro JCV. La valutazione può essere eseguita prima o dopo o nello stesso momento in cui il paziente sta ricevendo un trattamento, come per la SM. La valutazione si basa, almeno in parte, sull'analisi di un campione prelevato dal soggetto. La presenza di anticorpi anti-JCV può essere determinata mediante contatto con un agente legante specifico, ad esempio una proteina JCV, come VP1. L'agente legante può essere una proteina JCV, ad esempio VP1 sotto forma di una particella, ad esempio, una HPVLP.

In una forma di realizzazione, un'analisi per rilevare la presenza di anticorpi anti-JCV è un dosaggio in due fasi, come descritto qui. Il dosaggio utilizza HPVLP in condizioni adatte per

legare un anticorpo anti-JCV. Il dosaggio è in grado di rilevare qualsiasi isotipo di anticorpo anti-JCV (tra cui IgG, IgM, IgA e IgE). Il dosaggio è anche altamente sensibile e può rilevare anticorpi anti-JCV ad una concentrazione di, ad esempio, 2,0 µg/ml o meno, ad esempio 1,5 µg/ml o meno, 1,25 µg/ml o meno, 1,0 µg/ml o meno, 0,5 µg/ml o meno, 50 ng/ml o meno, 10  
5 ng/ml o meno, 5 ng/ml o meno, 1,7 ng/ml o meno, o 1 ng/ml o meno.

Il campione può essere analizzato per il livello di acido nucleico di JCV presente nel campione. Ad esempio, gli acidi nucleici possono essere isolati dal campione e utilizzati per l'amplificazione PCR o una tecnica di sequenziamento Next Generation (Nex-Gen).

Ad esempio un lisato grezzo del campione biologico è soggetto ad un metodo di  
10 amplificazione, come la PCR, e il prodotto amplificato viene analizzato mediante una o più elettroforesi, mappatura del frammento di restrizione, ibridazione o sequenziamento per identificare se il DNA o l'RNA di JCV è presente nel campione e quanto ne contiene il campione.

Il campione biologico può essere asportato dal paziente e analizzato.

15 In alcune forme di realizzazione, il campione del paziente può essere conservato prima del test per anticorpi JCV. Il campione del paziente, ad esempio il campione del paziente contenente anticorpi contro JCV può essere conservato per 1-21 giorni, ad esempio 1-14 giorni o 1-7 giorni o più (ad esempio, un giorno, due giorni, tre giorni, cinque giorni, sette giorni, dieci giorni, 14 giorni, 21 giorni o più); da una a sei settimane, ad esempio da una a tre settimane o da  
20 una a due settimane o più (ad esempio, fino a una settimana, fino a due settimane, fino a tre settimane, fino a sei settimane o più); o da uno a sei mesi, ad esempio da uno a tre mesi o da uno a due mesi o più (ad esempio, fino a un mese, fino a due mesi, fino a tre mesi, fino a sei mesi o più). Il campione può essere conservato, ad esempio, congelato (ad esempio, da -80 °C a -20 °C), a 2-8 °C, a temperatura ambiente (18 °C-25 °C) o più caldo, ad esempio, a 37 °C.

25 Come qui utilizzato, il termine "acquire" o "acquisendo" si riferisce all'ottenimento

del possesso di un'entità fisica, o un valore, ad esempio, un valore numerico, per “acquisizione diretta” o “acquisizione indiretta” dell'entità fisica o valore, ad esempio, lo stato di un paziente, come precedente esposizione a terapia anti-VLA-4 o altri immunosoppressori, stato JCV. "Acquisire direttamente" significa eseguire un processo (ad esempio, eseguire un metodo sintetico o analitico) per ottenere l'entità fisica o il valore. "Acquisizione indiretta" si riferisce alla ricezione dell'entità fisica o del valore da un'altra parte o fonte (ad esempio, un laboratorio di terzi che ha acquisito direttamente l'entità fisica o il valore). L'acquisizione diretta di un'entità fisica include l'esecuzione di un processo che include un cambiamento fisico in una sostanza fisica, ad esempio un materiale di partenza. Tra le modifiche esemplificative figura l'entità fisica di due o più materiali di partenza, la cimatura o la frammentazione di una sostanza, la separazione o la purificazione di una sostanza, la combinazione di due o più entità separate in una miscela, l'esecuzione di una reazione chimica che include la rottura o la formazione di una covalente o non legame covalente. L'acquisizione diretta di un valore comprende l'esecuzione di un processo che include una modifica fisica in un campione o in un'altra sostanza, ad esempio, l'esecuzione di un processo analitico che include un cambiamento fisico in una sostanza, ad esempio un campione, analita o reagente (a volte indicato come “analisi fisica”), che esegue un metodo analitico, ad esempio un metodo che include uno o più dei seguenti elementi: separazione o purificazione di una sostanza, ad esempio un analita o un frammento o altro suo derivato, da un'altra sostanza; combinare un analita o frammento o altro suo derivato con un'altra sostanza, ad esempio un tampone, un solvente o un reagente; o cambiare la struttura di un analita, o un frammento o altro suo derivato, ad esempio, rompendo o formando un legame covalente o non covalente, tra un primo e un secondo atomo dell'analita; oppure modificando la struttura di un reagente o un frammento o altro suo derivato, ad esempio, rompendo o formando un legame covalente o non covalente, tra un primo e un secondo atomo del reagente.

Almeno uno o entrambi tra determinare lo stato di un paziente (ad esempio, stato JCV)

o un livello di attività e determinare se lo stato ha una relazione preselezionata con un criterio di riferimento, include uno o più tra analizzare un campione, richiedere analisi del campione, richiedere i risultati dall'analisi del campione o ricevere i risultati dall'analisi del campione. [In generale, l'analisi può includere una o entrambe le modalità di esecuzione del metodo sottostante (ad esempio, un immunodosaggio) o la ricezione di dati da un altro che ha eseguito il metodo sottostante].

*Terapia anti-VLA-4.* Una terapia anti-VLA-4 è una molecola, ad esempio un piccolo composto molecolare o una proteina biologica (ad esempio, un anticorpo o un suo frammento, come un suo frammento legante l'antigene) che blocca l'attività di VLA-4. La molecola che è la terapia anti-VLA-4 è un antagonista di VLA-4. Un antagonista di VLA-4 include qualsiasi composto che inibisca l'integrina di VLA-4 dal legame di un ligando e/o recettore. Una terapia anti-VLA-4 può essere un anticorpo [ad esempio, natalizumab (TYSABRI®)] o un suo frammento, o una forma solubile di un ligando. Le forme solubili delle proteine ligando per le integrine  $\alpha 4$  includono VCAM-I solubile o fibronectina peptidi, proteine di fusione VCAM-I o proteine di fusione VCAM-I/Ig bifunzionali. Ad esempio, una forma solubile di un ligando VLA-4 o un suo frammento può essere somministrata per legarsi a VLA-4 e, in alcuni casi, competere per un sito di legame VLA-4 sulle cellule, portando così a effetti simili alla somministrazione di antagonisti come gli anticorpi anti-VLA-4. Ad esempio, i mutanti di integrina VLA-4 solubili che legano il ligando VLA-4 ma non suscitano segnalazione integrina-dipendente sono adatti per l'uso nei metodi descritti. Tali mutanti possono agire come inibitori competitivi della proteina integrina di tipo selvatico e sono considerati "antagonisti". Altri antagonisti adatti sono "piccole molecole".

"Piccole molecole" sono agenti che imitano l'azione dei peptidi per interrompere le interazioni VLA-4/ligando, ad esempio, legando VLA-4 e bloccando l'interazione con un ligando VLA-4 (ad esempio, VCAM-I o fibronectina) o legando un ligando VLA-4 e

impedendo al ligando di interagire con VLA-4. Una piccola molecola esemplare è un'oligosaccaride che imita il dominio di legame di un ligando VLA-4 (ad esempio, fibronectina o VCAM-I) e lega il dominio legante del ligando di VLA-4. [Si vedano Devlin et al., Science 249: 400-406 (1990), Scott and Smith, Science 249: 386-390 (1990) e brevetto US  
5 n. 4,833,092 (Geysen)].

Una "piccola molecola" può essere un composto chimico, ad esempio un composto organico o un piccolo peptide o un composto organico contenente peptidi più grandi o un composto organico non peptidico. Una "piccola molecola" non è destinata a comprendere un anticorpo o frammento di anticorpo. Sebbene il peso molecolare di piccole molecole sia  
10 generalmente inferiore a 2000 Dalton, questa cifra non è intesa come un limite superiore assoluto per il peso molecolare.

*Terapia combinata o alternative alla terapia anti-VLA-4.* In alcuni casi, la terapia anti-VLA-4, ad esempio, natalizumab, viene somministrata con un secondo agente oppure è possibile somministrare una terapia alternativa al posto della terapia anti-VLA-4, ad esempio  
15 quando un paziente è determinato a più alto rischio per PML.

Esempi non limitativi di secondi agenti per il trattamento della sclerosi multipla in combinazione con la terapia anti-VLA-4, o agenti alternativi da usare al posto della terapia anti-VLA-4, includono: sali di acido fumarico, come dimetilfumarato; antagonisti di sfingosina 1-fosfato (S1P), come l'anticorpo a blocchi SIB; interferone, come l'interferone beta-la umano [ad  
20 esempio, AVONEX<sup>®</sup> o Rebif<sup>®</sup>] e l'interferone P-1b (BETASERON<sup>®</sup> interferone umano  $\beta$  sostituito in posizione 17; Berlex/Chirone); glatiramer acetato (anche noto come Copolimero 1, Cop-1, COPAXONE<sup>®</sup> Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); un anticorpo o un suo frammento (come un suo frammento legante l'antigene), come un anticorpo anti-CD20, ad esempio, Rituxan<sup>®</sup> (rituximab), o un anticorpo o suo frammento che compete con o lega un epitopo  
25 sovrappONENTE con rituximab; mitoxantrone (NOVANTRONE<sup>®</sup>, Lederle); un agente

chemioterapico, come clabribina (LEUSTATIN®), azatioprina (IMURAN®), ciclofosfamide (CYTOXAN®), ciclosporina-A, metotrexato, 4-aminopiridina e tizanidina; un corticosteroide, come metilprednisolone (MEDRONE®, Pfizer) o prednisone; CTLA4 Ig; alemtuzumab (MabCAMPATH®) o daclizumab (un anticorpo che lega CD25); statine; e antagonisti del TNF.

5 Glatiramer acetato è una proteina formata da una catena casuale di amminoacidi [acido glutammico, lisina, alanina e tirosina (quindi GLATiramer)]. Glatiramer acetato può essere sintetizzato in soluzione da questi amminoacidi in un rapporto di circa 5 parti di alanina in 3 parti di lisina, 1,5 parti di acido glutammico e 1 parte di tirosina utilizzando anidridi di N-carbossiammino acido.

10 Altri secondi agenti, o agenti per l'uso al posto della terapia anti-VLA-4, includono anticorpi o antagonisti di altre citochine umane o fattori di crescita, ad esempio TNF, LT, IL-1, IL-2, IL -6, IL-7, IL-8, IL-12 IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-11, GM-CSF, FGF e PDGF. Ancora altri secondi agenti esemplificativi includono anticorpi a molecole di superficie cellulare come CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 o loro  
15 ligandi. Ad esempio, daclizumab è un anticorpo anti-CD25 che può migliorare la sclerosi multipla.

Ancora altri anticorpi esemplificativi includono anticorpi che forniscono un'attività di un agente qui descritto, come un anticorpo che impegna un recettore di interferone, ad esempio un recettore dell'interferone beta. Tipicamente, nelle implementazioni in cui il secondo agente  
20 include un anticorpo, si lega a una proteina bersaglio diversa da VLA-4 o diversa da una integrina  $\alpha 4$ , o almeno un epitopo su VLA-4 diverso da quello riconosciuto da natalizumab.

Altri ulteriori secondi agenti esemplificativi includono: FK506, rapamicina, micofenolato mofetile, leflunomide, farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS), ad esempio, inibitori della fosfodiesterasi, agonisti dell'adenosina, agenti antitrombotici, inibitori del  
25 complemento, agenti adrenergici, agenti che interferiscono con la segnalazione di citochine

proinfiammatorie come qui descritto, inibitori dell'enzima di conversione IL-1 $\beta$  (ad esempio Vx740), anti-P7s, PSGL, inibitori TACE, inibitori di segnalazione di cellule T come inibitori della chinasi, inibitori della metalloproteinasi, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurine, inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina, recettori delle citochine solubili e loro  
5 derivati, come qui descritto, citochine anti-infiammatorie (ad esempio IL-4, IL-10, IL-13 e TGF).

Un secondo agente può essere usato per trattare uno o più sintomi o effetti collaterali della SM. Tali agenti includono, ad esempio, amantadina, baclofen, papaverina, meclizina, idrossizina, sulfametossazolo, ciprofloxacina, docusato, pemolina, dantrolene, desmopressina,  
10 desametasone, tolterodina, fenitoina, ossibutinina, bisacodile, venlafaxina, amitriptilina, metenammina, clonazepam, isoniazide, vardenafil, nitrofurantoina, mucilloide psyllium idrofilo, alprostadil, gabapentin, nortriptilina, paroxetina, propantelina bromuro, modafinil, fluoxetina, fenazopiridina, metilprednisolone, carbamazepina, imipramina, diazepam, sildenafil, bupropione e sertralina. Molti secondi agenti che sono piccole molecole hanno un peso  
15 molecolare tra 150 e 5000 Dalton.

Esempi di antagonisti del TNF includono anticorpi chimerici, umanizzati, umani o *in vitro* (o suoi frammenti di legame all'antigene) di TNF (ad esempio, TNF- $\alpha$  umano), come D2E7, (anticorpo umano TNF-  $\alpha$ , brevetto USA n. 6,258,562 ; BASF), CDP-571/CDP-870/BAY-10-3356 (anticorpo anti-TNF-  $\alpha$  umanizzato; Celltech/Pharmacia), cA2 (anticorpo  
20 chimerico anti-TNF  $\alpha$ ; REMICADE <sup>TM</sup>, Centocor); frammenti di anticorpi anti-TNF (ad esempio, CPD870); frammenti solubili dei recettori del TNF, ad esempio recettori umani di TNF p55 o p75 o loro derivati, ad esempio, 75 kd di TNFR-IgG (75 kD proteina di fusione del recettore IgG anti-TNF, ENBREL<sup>TM</sup>; Immunex; si veda ad esempio Arthritis & Rheumatism 37:S295, 1994; J. Invest. Med. 44:235A, 1996); p55 kdTNFR-IgG (proteina di fusione del  
25 recettore IgG di 55 kD TNF (LENERCEPT <sup>TM</sup>); antagonisti enzimatici, ad esempio, inibitori

dell'enzima di conversione del TNF  $\alpha$  (TACE) (ad esempio, un derivato dell'acido alfa-sulfonilidrossammico, WO 01/55112 e inibitore TACE N-idrossiformammide GW 3333, -005, o -022); e TNF-bp/s-TNFR (proteina legante il TNF solubile, vedi, ad esempio, Arthritis & Rheumatism 39:S284, 1996; Amer. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology 268:37-42, 5 1995).

In una implementazione, la terapia anti-VLA-4 e il secondo agente sono forniti come co-formulazione e la co-formulazione è somministrata al soggetto. È inoltre possibile, ad esempio, almeno 24 ore prima o dopo la somministrazione della co-formulazione, somministrare separatamente una dose della formulazione della terapia anti-VLA-4 e quindi una 10 dose di una formulazione contenente il secondo agente. In un'altra implementazione, la terapia anti-VLA-4 e il secondo agente sono forniti come formulazioni separate e la fase di somministrazione comprende la somministrazione sequenziale della terapia anti-VLA-4 e il secondo agente. Le amministrazioni sequenziali possono essere fornite lo stesso giorno (ad esempio, entro un'ora l'una dall'altra o almeno 3, 6 o 12 ore di distanza) o in giorni diversi.

15 La terapia anti-VLA-4 e il secondo agente ciascuno possono essere somministrati separatamente come una pluralità di dosi nel tempo. La terapia anti-VLA-4 e il secondo agente sono tipicamente somministrati ciascuno secondo un regime. Il regime per uno o entrambi può avere periodicità regolare. Il regime per la terapia anti-VLA-4 può avere una diversa periodicità dal regime per il secondo agente, ad esempio, uno può essere somministrato più frequentemente 20 rispetto all'altro. In un'implementazione, una delle terapie anti-VLA-4 e il secondo agente vengono somministrati una volta alla settimana e l'altra una volta al mese. In un'altra implementazione, una delle terapie anti-VLA-4 e il secondo agente vengono somministrati continuamente, ad esempio, per un periodo superiore a 30 minuti ma inferiore a 1, 2, 4 o 12 ore e l'altro viene somministrato come bolo. La terapia anti-VLA-4 e il secondo agente possono 25 essere somministrati con qualsiasi metodo appropriato, ad esempio per via sottocutanea,

intramuscolare o endovenosa.

Ciascuna terapia anti-VLA-4 e il secondo agente possono essere somministrati alla stessa dose di ciascuno di essi è prescritto per monoterapia. In altri casi, la terapia anti-VLA-4 può essere somministrata a un dosaggio uguale o inferiore a una quantità richiesta per l'efficacia se somministrata da sola. Allo stesso modo, il secondo agente può essere somministrato a un dosaggio uguale o inferiore a una quantità richiesta per l'efficacia se somministrato da solo.

*Kit.* I reagenti per l'esecuzione di un test degli anticorpi anti-JCV possono essere forniti sotto forma di kit. Ad eccezione del campione del paziente, nel kit possono essere forniti alcuni o tutti i materiali necessari per il test. Un kit può includere, ad esempio, un substrato, come una piastra con pozzetti rivestiti con substrato antigene JCV, ad esempio HPVLP. La piastra può essere ad esempio una piastra da 6 pozzetti, una piastra da 12 pozzetti, una piastra da 24 pozzetti, una piastra da 48 pozzetti, una piastra da 96 pozzetti o una piastra da 384 pozzetti. Le piastre fornite in un kit possono essere pre-rivestite con l'antigene JCV VLP, ad esempio a 0,4 µg/ml. Il kit può comprendere materiali e reagenti da utilizzare con sistemi ad alto rendimento come i puntali SPR (Solid Phase Receptacle) da utilizzare con i sistemi bioMerieux.

Il kit può anche includere antigene JCV, ad esempio HPVLP liofilizzato o in soluzione, come per l'uso con la fase di conferma del test. Il kit può includere un calibratore cut-off JCV, un controllo positivo dell'anticorpo anti-JCV e un controllo negativo JCV, che sono campioni di sieri, come i sieri umani. Le soluzioni contenenti antigene e sieri JCV possono includere un conservante, come sodio azide, ad esempio 0,05%, 0,1%, 1,5% e sodio azide al 2%. Un kit può includere uno o più reagenti per la rilevazione di un complesso contenente anticorpi anti-JCV legati all'antigene, come HPVLP. I reagenti per la rilevazione del complesso includono, ad esempio, un coniugato JCV, un campione di caseina, un reagente rilevabile, come TMB (tetrametilbenzidina), un tampone di lavaggio e un reagente di arresto.

Il substrato JCV può essere, ad esempio, un anticorpo anti-umano, come un anticorpo

  
Ing. Ines Sangiacomo  
Consulente in F.I. n° USBM-041R

anti-umano coniugato con enzima. Il coniugato JCV può essere un anticorpo anti-umano asino coniugato con affinità e perossidasi coniugato. In un altro caso, la soluzione di caseina contiene caseina, un tensioattivo e un conservante non azidico nel tampone [ad esempio, soluzione salina tamponata con fosfato (PBS)]. La soluzione di substrato TMB può includere TMB e perossido di idrogeno nel tampone. Il kit può includere un tampone di lavaggio e il tampone di lavaggio può contenere, ad esempio, tensioattivo in PBS con conservanti non azotati. Il reagente di arresto può essere, ad esempio, un acido, come acido solforico (ad esempio, acido solforico 1 M).

Le soluzioni fornite nel kit possono essere fornite a livelli concentrati in modo tale che sia necessaria la diluizione prima dell'uso. L'HPVLP da utilizzare nella soluzione legante all'anticorpo anti-JCV in un campione biologico, come nella fase di conferma del dosaggio in due fasi, può essere fornito come concentrazione di 2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, per uso a, ad esempio, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 1 µg/ml, 0,8 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,2 µg/ml. Il tampone di lavaggio, ad esempio, può essere fornito a concentrazione 10x. Il substrato JCV (come un anticorpo anti-uomo asino purificato per affinità e perossidasi coniugato con affinità) può essere fornito, ad esempio, 1 mg/ml, 0,8 mg/ml o 0,6 mg/ml, per diluizione, ad esempio, 1:40.000, 1:30.000, 1:20.000 o 1:20.000 prima dell'uso in un test di rilevazione di anticorpi anti-JCV.

I materiali per sigillare le miscele di reazione, come i nastri sigillanti, possono anche essere inclusi nel kit.

*Segnalazione dei risultati.* I risultati dell'analisi di valutazione del rischio possono essere segnalati, come ad esempio un centro di cura, un operatore sanitario o un assicuratore. I risultati della valutazione del rischio possono essere memorizzati in un database. Può essere fornito materiale informativo per eseguire e interpretare la valutazione del rischio. Il materiale informativo può fornire indicazioni su dove riportare i risultati della valutazione, come ad esempio un centro di cura o un fornitore di servizi sanitari o un fornitore di database. Il

materiale informativo può essere fornito in un kit o in un pacchetto e può includere moduli per riportare i risultati della valutazione, inclusi ogni polo della valutazione (informazioni relative al trattamento precedente con terapie anti-VLA-4, trattamento precedente con immunosoppressori e Stato JCV), indirizzo e informazioni di contatto su dove inviare tali moduli o altre  
5 informazioni correlate; oppure un indirizzo URL (Uniform Resource Locator) per riportare i risultati in un database online o un'applicazione online (ad esempio, una "app"). Il materiale informativo può includere una guida per stabilire se un paziente debba ricevere un trattamento con una terapia anti-VLA-4, a seconda del rischio di PML del paziente in base ai risultati della valutazione del rischio.

10 Il kit o il pacchetto può anche includere istruzioni e articoli per la raccolta o il trasporto di un campione di un paziente a un operatore sanitario, o per ricevere un campione da un operatore sanitario, o per eseguire i metodi valutativi qui descritti. Ad esempio, oltre alle informazioni didattiche, un kit o pacchetto caratterizzato nell'invenzione può includere uno o  
15 più tamponi o raschietti o una nave (ad esempio una tazza, una provetta, un'ampolla o una busta) per raccogliere, conservare e trasportare un campione biologico. Il kit o il pacchetto può contenere anche forniture per l'esecuzione di un test immunologico o sequenziamento per il rilevamento di anticorpi contro JCV o acidi nucleici, rispettivamente.

Un kit può includere uno o più contenitori per i reagenti necessari per un test, ad esempio un test di rilevamento di JCV. I reagenti possono essere forniti in una concentrazione  
20 adatta per l'uso nel dosaggio o con le istruzioni per la diluizione da utilizzare nel dosaggio. Il kit può contenere contenitori separati, divisori o compartimenti per i componenti del saggio e il materiale informativo. Ad esempio, i componenti del saggio possono essere contenuti in una bottiglia o flacone e il materiale informativo può essere contenuto in un manicotto o pacchetto di plastica. Gli elementi separati del kit possono essere contenuti in un singolo contenitore  
25 indiviso. Ad esempio, un reagente di analisi è contenuto in una bottiglia o flaconcino che ha

allegato il materiale informativo sotto forma di etichetta. In alcuni casi, il kit include una pluralità (ad esempio, una confezione) di singoli contenitori, ciascuno contenente una o più forme unitarie (ad esempio, per l'uso con un dosaggio) di un componente del dosaggio. Ad esempio, il kit include una pluralità di ampolle, pacchetti di alluminio o blister, ciascuno  
5 contenente una singola unità di reagente per l'analisi da utilizzare in un test di screening o di conferma. I contenitori dei kit possono essere a tenuta d'aria e/o impermeabili. Il contenitore può essere etichettato per l'uso.

Il materiale informativo di un kit o pacchetto non è limitato nella sua forma. In molti casi, il materiale informativo, ad esempio le istruzioni, viene fornito su materiale stampato, ad  
10 esempio un testo stampato, un disegno e/o una fotografia, ad esempio un'etichetta o un foglio stampato. Tuttavia, il materiale informativo può anche essere fornito in altri formati, come materiale leggibile da computer, registrazione video o registrazione audio. Il materiale informativo del kit può contenere le informazioni di contatto, ad esempio un indirizzo fisico, un  
15 indirizzo e-mail, un sito Web o un numero di telefono, in cui un utente del kit o pacchetto può ottenere informazioni sostanziali su come trovare le informazioni richieste per l'analisi della valutazione del rischio, ad esempio dove e come identificare i trattamenti precedenti somministrati a un soggetto e come eseguire un test per determinare lo stato JCV di un paziente. Il materiale informativo può anche essere fornito in qualsiasi combinazione di formati.

Un campione biologico può essere fornito a un fornitore di analisi, ad esempio un  
20 fornitore di servizi (come una struttura di terze parti) o un operatore sanitario, che valuta il campione in un test e fornisce una lettura. Ad esempio, un fornitore di saggio riceve un campione biologico da un soggetto, come un plasma, sangue o campione di siero, e valuta il campione usando un saggio descritto qui, e determina che il campione contiene anticorpi contro JCV o acido nucleico. Il fornitore del saggio, ad esempio un fornitore di servizi o un fornitore di  
25 assistenza sanitaria, può determinare ulteriormente, ad esempio, contattando un operatore

sanitario o un fornitore di servizi di database, la quantità di precedente terapia anti-VLA-4 che un paziente ha ricevuto o se un paziente ha precedentemente ricevuto un trattamento con un immunomodulatore. Il fornitore del test può inoltre determinare che il soggetto non è un candidato a ricevere un trattamento con una terapia anti-VLA-4, come natalizumab, o che il  
5 soggetto è candidato a ricevere un trattamento con un immunomodulatore, o che il soggetto può essere un candidato che dovrebbe avere un monitoraggio potenziato rispetto a un soggetto che è determinato ad avere uno stato JCV negativo (ad esempio. chi esegue il test negativo per l'acido nucleico di JCV o gli anticorpi anti-JCV). Ad esempio, un candidato che ha ricevuto un precedente trattamento con una terapia anti-VLA-4 per 24 mesi o meno e che non ha ricevuto  
10 una precedente terapia con un immunosoppressore, ma che è determinato a essere positivo JCV, può essere selezionato come candidato ricevere un'ulteriore terapia anti-VLA-4, ma con una raccomandazione per monitorare il paziente più frequentemente per lo sviluppo di sintomi avversi, come i sintomi che potrebbero indicare lo sviluppo di PML. Il fornitore del test esegue una valutazione del rischio di PML come descritto nel presente documento e determina che il  
15 soggetto è candidato a ricevere un trattamento con una terapia anti-VLA-4, come il natalizumab. In un caso, il fornitore del test informa un operatore sanitario che il soggetto è un candidato per il trattamento con la terapia anti-VLA-4 e al candidato viene somministrata la terapia anti-VLA-4. Ad esempio, il fornitore del saggio può determinare che un paziente ha un rischio più basso per la PML e successivamente informare l'operatore sanitario della determinazione del rischio  
20 più basso e che il soggetto è un candidato per il trattamento con la terapia anti-VLA-4.

In un altro esempio, il fornitore del test determina che un paziente ha un rischio più elevato per la PML e successivamente informa un operatore sanitario della determinazione del rischio più elevato e raccomanda che il paziente sia un candidato per il trattamento con l'anti-VLA -4 terapia, ma che il paziente dovrebbe sottoporsi a un aumento dei test per la PML e,  
25 facoltativamente, lo stato di JCV. Il fornitore del test può informare l'operatore sanitario che il

paziente è a più alto rischio di PML e quindi il paziente deve ricevere un'alternativa alla terapia anti-VLA-4, o il paziente è un candidato a ricevere la terapia anti-VLA-4 con un aumento dei test per PML e, facoltativamente, lo stato di JCV.

Il fornitore del saggio può fornire i risultati della valutazione del rischio e, facoltativamente, le conclusioni riguardanti una o più diagnosi, prognosi o opzioni terapeutiche appropriate, ad esempio, un operatore sanitario o un paziente o una compagnia di assicurazioni, in qualsiasi formato adatto, ad esempio per posta o per via elettronica o tramite un database online. Le informazioni raccolte e fornite dal fornitore del test possono essere memorizzate in un database. Un operatore sanitario o un assicuratore o un'altra entità consiglia, ad esempio, al paziente o a un secondo operatore sanitario, che un paziente si sottoponga a una valutazione del rischio per la PML come descritto nel presente documento.

Gli strumenti di stratificazione del rischio PML sono utili come un componente nel prendere decisioni di trattamento individuali a rischio per i pazienti che assumono o stanno prendendo in considerazione l'assunzione di un inibitore VLA4 o altre terapie note per aumentare il rischio di sviluppare PML. La quantificazione del rischio di PML di un paziente può essere utilizzata, ad esempio, nell'analisi del rischio-beneficio.

Le intestazioni, ad esempio (a), (b), (i) ecc., sono presentate semplicemente per facilitare la lettura delle specifiche e delle rivendicazioni. L'uso delle intestazioni nelle specifiche o nelle rivendicazioni non richiede che i passaggi o gli elementi siano eseguiti in ordine alfabetico o numerico o nell'ordine in cui sono presentati.

L'invenzione è ulteriormente illustrata dai seguenti esempi, che non dovrebbero essere interpretati come ulteriore limitazione.

## **ESEMPI**

Esempio 1. Il rischio di PML in pazienti con SM è stato quantificato per la prima volta utilizzando i due fattori di rischio stabiliti e lo stato di anticorpi anti-JCV come determinato

mediante un ELISA univoco per VP1 basato su VLP in due fasi.

## **Metodi**

### **Pazienti, campioni e raccolta dati**

A causa della scarsa frequenza della PML, i dati sui pazienti con PML trattati con natalizumab sono stati raccolti da diverse fonti, compresi i dati post-marketing dal database di sicurezza globale natalizumab di Biogen Idec e studi clinici al 4 marzo 2011. Non erano disponibili dati sull'uso di immunosoppressori precedenti per tutti i pazienti esposti a natalizumab; pertanto, la proporzione di pazienti con e senza precedente uso di immunosoppressori nel Programma di osservazione globale in sicurezza di TYSABRI® (TYGRIS, NCT00477113, NCT00483847) è stata utilizzata come stima per la popolazione complessiva trattata con natalizumab. TYGRIS è uno studio di coorte osservazionale progettato per ottenere dati di sicurezza a lungo termine in pazienti con SM trattati con natalizumab in contesto di pratica clinica. La valutazione della prevalenza degli anticorpi anti-JCV nella popolazione generale di SM era basata su un singolo plasma al basale o su un campione di siero prelevato da pazienti di quattro fonti, inclusi studi clinici in corso o completati con natalizumab [AFFIRM (Polman et al., N. Engl. J. Med. 354: 899-910, 2006; STRATIFY-1 (NCT01070823)], TYGRIS-US e un registro indipendente in Svezia (disponibile su Internet all'indirizzo [msreg.net/cms/sv/home](http://msreg.net/cms/sv/home), accessibile il 3 febbraio 2011). È stato sviluppato un piano clinico per la raccolta su vasta scala di campioni di siero e plasma ottenuti prima della diagnosi PML, inclusi casi clinici e post-commercializzazione.

### **Identificazione della durata del trattamento con natalizumab come fattore di rischio per la PML**

Stime dell'incidenza di PML dalla reintroduzione sul mercato di natalizumab sono state calcolate sulla base dell'esposizione post-commercializzazione di natalizumab fino al 28 febbraio 2011 e del numero di casi di PML confermati a maggio 2011. L'incidenza di PML per

ciascun periodo (durata cumulativa o 12 mesi intervallo di trattamento) è stata calcolata utilizzando il numero di pazienti che hanno sviluppato PML durante quel periodo di tempo diviso per il numero di pazienti mai esposti a natalizumab per quel periodo di tempo. Con

#### **Identificazione del precedente uso di immunosoppressori come fattore di rischio per la**

#### **5 PML**

Le storie di trattamento con immunosoppressori di pazienti con SM trattati con natalizumab che hanno sviluppato PML nel setting post-commercializzazione e studi clinici sono stati ottenuti dal database di sicurezza globale di natalizumab di Biogen Idec il 2 novembre 2010 e confrontati con i dati ottenuti da TYGRIS. La data limite per la precedente storia di uso  
10 di immunosoppressori è stata scelta (rispetto al 4 marzo 2011 per tutti gli altri dati) in quanto si prevede che l'inclusione di questo fattore di rischio nell'etichettatura (dicembre 2010 nell'UE) (inserto informativo TYSABRI<sup>®</sup> (natalizumab) Biogen Idec, Weston, MA Luglio 2010, Riassunto delle caratteristiche del prodotto TYSABRI<sup>®</sup> (natalizumab), Biogen Idec, Weston, MA, 13 dicembre 2010) sarebbe un fattore di confusione.

#### **15 Identificazione dello stato degli anticorpi anti-JCV come fattore di rischio per la PML**

La prevalenza complessiva di anticorpi anti-JCV nella popolazione generale di SM è stata determinata utilizzando un unico ELISA per VP1 VLP a due fasi come precedentemente descritto (Gorelik et al., Ann. Neurology, 2010). La prevalenza di anticorpi anti-JCV in pazienti con sclerosi multipla con PML in cui campioni di siero o plasma pre-PML erano disponibili  
20 prima della diagnosi è stata determinata utilizzando questo test e confrontato con la prevalenza complessiva nella popolazione generale di SM.

#### **Stima dell'incidenza di PML dallo stato sierico di anticorpi anti-JCV**

L'incidenza di PML in pazienti positivi e negativi agli anticorpi anti-JCV è stata stimata utilizzando l'incidenza globale di PML e l'incidenza dopo 25-48 infusioni (il punto temporale  
25 dopo il quale l'aumento dell'incidenza di PML era più pronunciato in questa analisi), la

prevalenza di anticorpi anti-JCV nella popolazione generale di SM e il numero di pazienti con SM con PML che avevano campioni pre-PML disponibili che hanno testato l'anticorpo anti-JCV positivo prima della diagnosi. È stato utilizzato un test esatto di Fisher su un lato per confrontare l'incidenza stimata della PML nei pazienti con anticorpi positivi all'anticorpo anti-JCV e anti-  
5 JCV. Per fornire una stima conservativa dell'incidenza di PML nei pazienti con anticorpi anti-JCV negativi, è stata eseguita un'analisi di sensibilità per valutare l'impatto di un ipotetico caso PML negativo agli anticorpi anti-JCV su questa stima. Inoltre, è stata eseguita un'analisi di sensibilità per valutare la certezza statistica di questa stima variando il numero di casi di PML positivi agli anticorpi anti-JCV.

10 **Quantificazione del rischio di PML: precedente uso di immunosoppressori, durata del trattamento con natalizumab e stato positivo degli anticorpi anti-JCV**

Gli algoritmi del fattore di rischio sono stati sviluppati per stimare l'incidenza di PML in pazienti con e senza determinati fattori di rischio per PML associata a natalizumab e sierotipo di anticorpo anti-JCV. Questi algoritmi hanno stimato il rischio di PML mediante un precedente  
15 uso di immunosoppressori (sì o no), durata del trattamento con natalizumab (da 1 a 24 mesi e da 25 a 48 mesi) e stato degli anticorpi anti-JCV. Questi algoritmi di rischio erano basati sui dati di incidenza di PML per la durata del trattamento con natalizumab (1-24 o 25-48 mesi) e stime di precedente uso immunosoppressore in pazienti trattati con natalizumab da TYGRIS e in quelli con PML. Inoltre, la prevalenza stimata complessiva di anticorpi anti-JCV nella popolazione  
20 generale di SM è stata utilizzata per imputare l'incidenza di PML associata allo stato sierico per l'algoritmo di rischio a tre fattori, assumendo che tutti i casi confermati di PML associata a natalizumab fossero positivi per un anticorpo anti-JCV prima della diagnosi. È stata eseguita un'analisi di sensibilità per quantificare l'effetto della variazione delle stime utilizzate per sviluppare questo algoritmo a tre fattori basato sui valori più alti e più bassi osservati.

25 **Risultati**

### **Identificazione della durata del trattamento con natalizumab come fattore di rischio per la PML**

A livello mondiale, sono stati identificati 102 casi confermati di PML a partire dal 4 marzo 2011. Complessivamente, il rischio di PML è aumentato con l'aumentare della durata del trattamento (figura 1A), con il maggiore aumento del rischio dopo due anni di terapia, con un picco a 1,68 casi ogni 1000 pazienti nell'anno tre (figura 1B). I dati oltre i quattro anni erano limitati.

### **Identificazione del precedente uso di immunosoppressori come fattore di rischio per la PML**

L'uso precedente di immunosoppressori era più comune nei pazienti trattati con natalizumab che hanno sviluppato PML rispetto ai pazienti arruolati in TYGRIS, che rappresentava la popolazione complessiva di pazienti trattati con natalizumab. Il 45% dei pazienti con PML trattati con natalizumab ha ricevuto una o più terapie immunosoppressive prima di iniziare il trattamento con natalizumab, rispetto al 20,3% nei pazienti trattati con natalizumab (13,9% negli Stati Uniti e 23,6% nell'UE) da TYGRIS. I più comuni immunosoppressori usati nella popolazione di PML trattati con natalizumab e in TYGRIS includevano mitoxantrone, metotrexato, ciclofosfamide, azatioprina e micofenolato senza alcun modello specifico nel tipo di immunosoppressore, durata d'uso o periodo di wash-out tra interruzione dell'immunosoppressore e avvio di natalizumab (Tabella 1).

Tabella 1. Anamnesi dell'uso precedente di immunosoppressori in pazienti con PML associati a natalizumab e pazienti arruolati in TYGRIS.

<b>Caratteristiche</b>	<b>Tutti i casi confermati di PML post-commercializzazione con precedente uso di immunosoppressori (N = 32)</b>	<b>Pazienti TYGRIS con precedente uso di immunosoppressori (N=792)</b>
Immunosoppressori precedenti		
Mitoxantrone	18 (56%)	344 (43%)

Ing. Ines Sangiacomo  
Consulente in F.I. n° USBM-041R

Metotrexato	5 (16%)	45 (6%)
Azatioprina	5 (16%)	133 (17%)
Ciclofosfamide	6 (19%)	71 (9%)
Micofenolato	4 (13%)	48 (6%)
Altro	3 (9%)	201 (25%)
Durata del precedente uso di immunosoppressori	0,03-204 mesi	<1-24 mesi
Intervallo	30 6 mesi	10 1 mesi
Media		
Periodo di wash-out		
Intervallo	2-93 mesi	<1-24 mesi
Media	24.7 mesi	8.5 mesi

### **Quantificazione del rischio di PML: durata del trattamento con natalizumab e precedente uso di immunosoppressori**

Quando i pazienti sono stati stratificati per durata del trattamento con natalizumab (1-24 o 25-48 mesi) e precedente uso immunosoppressore (sì o no), sono stati identificati quattro sottogruppi distinti di pazienti rispetto all'incidenza di PML (figura 2). Tre di questi sottogruppi avevano un'incidenza di PML stimata inferiore o uguale a 1 su 1000. Il rischio di PML era più basso nei pazienti trattati con natalizumab per 1-24 mesi e che non avevano ricevuto una precedente terapia immunosoppressiva, 0,19 per 1000 (95% CI: 0 · 10-0 · 33). Il quarto sottogruppo, compresi i pazienti che presentavano entrambi questi fattori di rischio per la PML, presentava il rischio più elevato, con un'incidenza di PML stimata di 4 3 per 1000 (CI 95%: 2 9-6 2).

### **Identificazione dello stato degli anticorpi anti-JCV come fattore di rischio per la PML**

5.896 pazienti di AFFIRM, TYGRIS-USA, STRATIFY-1 e Swedish Swedish Registry avevano un campione di base disponibile per il test degli anticorpi anti-JCV. I dati demografici, compresa la durata del trattamento con natalizumab e la precedente storia di uso di immunosoppressori, se disponibili, erano simili tra queste fonti di dati (Tabella 2). La prevalenza complessiva degli anticorpi anti-JCV nella popolazione generale di SM valutata in questo studio era del 55% (CI 95%: 54-56%).

Tabella 2. Prevalenza degli anticorpi anti-JCV e dati demografici della popolazione generale di

SM.

	<b>AFFIRM (N=823)</b>	<b>TYGRIS-US (N=1480)</b>	<b>STRATIFY-1 (N=1096)</b>	<b>Pazienti svedesi con SM (N=2497)</b>
Prevalenza anticorpo anti-JCV	54.6% (51.1-58.0)	47.6% (45.0-50.1)	56.0% (53.0-59.0)	59.0% (57.0-60.9)
Età (anni)				
Intervallo	18-50	18-75	12-75	12-75
Media	35,9	44,3	44,4	37,5
Mediana	36	44	45	37
Sesso (%)				
Maschio	30.6%	24.1%	24.3%	28.1%
Femmina	69.4%	75.9%	75.7%	71.9%
Geografia	Nord America ed UE/resto del mondo	USA e Canada	USA	Svezia
Immunosoppressore precedente				
Uso (%)				
Sì	3.6%	8.8%	3.8%	ND
No	96.4%	91.2%	96.2%	ND

Nel dataset TYGRIS-USA, 1451 dei 1480 pazienti avevano informazioni sull'età, il sesso e le precedenti informazioni immunosoppressive disponibili. Nel set di dati STRATIFY-1, 988 pazienti su 1096 avevano a disposizione informazioni immunosoppressive precedenti. Nel set di dati svedese di SM, 2464 su 2497 pazienti avevano informazioni sull'età disponibili e 2494 su 2497 pazienti avevano informazioni disponibili relative al sesso. L'uso precedente di immunosoppressori non era disponibile (ND) nei pazienti svedesi con SM.

Uno o più campioni pre-PML sono stati ottenuti da 25 pazienti con SM trattati con natalizumab 6,5-187 mesi prima della diagnosi PML. Come mostrato nella Tabella supplementare 1, questi 25 pazienti presentavano caratteristiche cliniche simili ai 102 casi di PML confermati in tutto il mondo, indicando assenza di evidenti errori di selezione. Tutti i pazienti per i quali sono stati disponibili più campioni pre-PML hanno testato anticorpi anti-JCV positivi in tutti i momenti, compresi i campioni raccolti prima dell'inizio del trattamento

Ing. Ines Sangiacomo  
Consulente in F.I. n° USBM-041R

con natalizumab. La prevalenza positiva dell'anticorpo anti-JCV al 100% (25 su 25) nei pazienti con LMC trattati con natalizumab prima della diagnosi di PML era significativamente diversa dalla prevalenza del 55% osservata nella popolazione generale di SM ( $p < 0 \cdot 0001$ ), dimostrando la capacità dello stato anticorpale anti-JCV di fungere da ulteriore strumento di stratificazione del rischio PML.

Tabella supplementare 1. Caratteristiche cliniche di 25 pazienti PML con SM con campioni pre-PML rispetto a tutti i 102 casi di PML post-commercializzazione

<b>Caratteristiche</b>	<b>Pazienti con SM con campioni pre-PML – positivi al test dell’anticorpo anti-JCV (N = 25)</b>	<b>Tutti i casi di PML confermata commercializzazione (N = 102)</b>
<b>Distribuzione geografica</b>		
USA	4 (16%)	42 (41%)
Europa/RdM	21 (84%)	60 (59%)
<b>Età alla diagnosi</b>		
Intervallo	27 - 55	23 - 67
Media	40.7	44.6
Mediana	41	44
<b>Sesso</b>		
Maschio	8 (32%)	32 (31%)
Femmina	17 (68%)	70 (69%)
<b>Durata della SM alla diagnosi (anni)</b>		
Intervallo	1 5-21	1 5-23
Media	12.2	11.9
Mediana	12.3	11.1
<b>Esposizione a TYSABRI® (mesi)</b>		
Intervallo	17-51	12-52
Media	33.0	30.8
Mediana	32	30
<b>Immunosoppressori precedenti</b>		

  
Ing. Ines Sangiacomo  
Consulente in F.I. n° USBM-041R

<b>Caratteristiche</b>	<b>Pazienti con SM con Tutti i casi di PML campioni pre-PML – tutti confermata positivi al test dell’anticorpo commercializzazione (N = anti-JCV (N = 25) 102)</b>
Distribuzione geografica	
Sì	9 (38%) 39 (42%)
No	15 (63%) 54 (58%)

La data di insorgenza della SM era sconosciuta per 5 pazienti nel gruppo positivo ad anticorpo anti-JCV e 38 pazienti in tutto il gruppo PML. Lo stato di uso precedente di immunosoppressori era sconosciuto per 1 paziente nel gruppo positivo ad anticorpo anti-JCV e 9 pazienti nel gruppo PML globale.

#### 5 **Stima dell’incidenza di PML in base allo stato sierico dell’anticorpo anti-JCV**

L’incidenza di PML in pazienti che erano positivi all’anticorpo anti-JCV era stimata essere quasi 2 volte quella della popolazione globale trattata con natalizumab (Tabella 4). Per stimare l’incidenza globale di PML in base allo stato dell’anticorpo anti-JCV, è stato usato il seguente metodo: sulla base di 25 pazienti con SM trattati con natalizumab con campioni pre-PML disponibili, è stato stimato che i 25 pazienti con SM con PML arrivavano da circa 20276  
10 pazienti trattati con natalizumab, sulla base del tasso globale di PML, 1,23 per 1000 pazienti (Figura 1). Supponendo che il 55% di questi 20276 pazienti fosse positivo all’anticorpo anti-JCV (vale a dire, 11152 pazienti) e il 45% fosse negativo all’anticorpo anti-JCV (vale a dire, 9124 pazienti), l’incidenza di PML in pazienti positivi all’anticorpo anti-JCV era stimata essere  
15 di 2,24 casi per 1000 pazienti trattati ( $=1000 \times 25 / 11152$ ), CI 95%: 1,45-3,31, simile al tasso stimato in letteratura (Tyler, Ann. Neurol. 68:271-274, 2010). Al contrario, l’incidenza stimata di PML in pazienti negativi all’anticorpo anti-JCV era di 0 casi per 1000 pazienti (CI 95%: 0-0,40), significativamente diverso dall’incidenza stimata in pazienti positivi all’anticorpo anti-JCV,  $p < 0,0001$ .

20 Tabella 4. Incidenza stimata di PML in base allo stato anticorpale anti-JCV sulla base di 25 casi

di PML che erano positivi all'anticorpo anti-JCV prima dell'insorgenza di PML.

	Numero casi di PML	di Pazienti trattati	totali Incidenza pazienti (CI 95%)	per 1000
<b>Incidenza globale di PML in pazienti con SM trattati con natalizumab</b>				
Positivo all'anticorpo anti-JCV	25	11152	2.24 (1.45, 3.31)	
Negativo all'anticorpo anti-JCV	0	9124	0 (0, 0.40)	
Totale	25	20276	1.23 (0.80, 1.82)	
Valore P		<0.0001		
RR (CI 95%)		$\infty$ (6.44, $\infty$ )		
<b>Incidenza di PML dopo 25-48 mesi di terapia con natalizumab</b>				
Positivo all'anticorpo anti-JCV		18	4533	3.97 (2.36, 6.27)
Negativo all'anticorpo anti-JCV		0	3709	0 (0, 0.99)
Totale		18	8242	2.18 (1.30, 3.45)
Valore P			<0.0001	
RR (CI 95%)			$\infty$ (5.63, $\infty$ )	
<b>Analisi della sensibilità: ipotesi di 1 ipotetico paziente con PML negativo all'anticorpo anti-JCV</b>				
Positivo all'anticorpo anti-JCV		25	11598	2.16 (1.40, 3.18)
Negativo all'anticorpo anti-JCV		1	9489	0.11 (0.00, 0.59)
Totale		26	21087	1.23 (0.81, 1.81)
Valore P			<0.0001	
RR (CI 95%)			20.5 (3.35, 842)	

L'effetto della durata del trattamento con natalizumab su questa stima era valutata in un'analisi usando l'incidenza di PML dopo 25-48 mesi di natalizumab (la durata della terapia dopo la quale l'aumento dell'incidenza era massimamente pronunciato). Il rischio di PML dopo 25-48 mesi di terapia in pazienti positivi all'anticorpo anti-JCV era di 3,97 per 1000 pazienti (CI 95%: 2,36-6.27) e in pazienti negativi all'anticorpo anti-JCV era 0 per 1000 (CI 95%: 0-0,99),  
5 Tabella 3.

Al momento della presente stesura, l'incidenza di PML in pazienti negativi all'anticorpo

Ing. Ines Sangiacomo  
Consulente in F.I. n° USBM-041R

anti-JCV non poteva essere completamente accertata perché non vi erano casi di PML risultati negativi al test dell'anticorpo anti-JCV prima della diagnosi. Pertanto, per stimare l'incidenza di PML in pazienti negativi all'anticorpo anti-JCV, un'analisi della sensibilità era eseguita presupponendo che un caso ipotetico di PML si fosse verificato in un paziente negativo all'anticorpo anti-JCV, consentendo così la determinazione di una stima conservativa per cui il tasso è verosimilmente inferiore. Questa analisi dimostrava un'incidenza stimata di PML in pazienti negativi all'anticorpo anti-JCV di almeno 20 volte inferiore rispetto a pazienti positivi all'anticorpo anti-JCV,  $p < 0.0001$  (Tabella 3).

L'analisi della sensibilità dell'effetto dell'aumento del numero di pazienti PML positivi all'anticorpo anti-JCV con campioni pre-PML disponibili risultati positivi al test dell'anticorpo anti-JCV dimostrava che la certezza statistica relativamente al rischio aumentata di PML in pazienti positivi all'anticorpo anti-JCV non era aumentata oltre 25 campioni pre-PML disponibili (Tabella 5).

Tabella 5. Effetto dell'aumento del numero di casi di PML positivi all'anticorpo anti-JCV sulla certezza statistica di stime di incidenza di PML in pazienti positivi all'anticorpo anti-JCV.

Numero di casi di PML positivi all'anticorpo anti-JCV sottoposti a test della diagnosi di PML	Incidenza di PML per 1000 pazienti				Valore P a una coda:
	Negativo all'anticorpo anti-JCV		Positivo all'anticorpo anti-JCV		
	Incidenza	CI 95%	Incidenza	CI 95%	
10	0	0, 1-01	2-24	1-08, 4-12	$p=0.025$
25	0	0, 0-40	2-24	1-45, 3-31	$P < 0.0001$
30		0, 0-34		1-51, 3-20	
40		0, 0-25		1-60, 3-05	
50		0,		1-66,	

Ing. Ines Sangiacomo  
Consulente in F.I. n° USBM-041R

Numero di casi di PML positivi all'anticorpo JCV sottoposti a test della diagnosi di PML	PML anti- prima	Incidenza di PML per 1000 pazienti				Valore P a una coda:
		Negativo all'anticorpo anti-JCV		Positivo all'anticorpo anti-JCV		
		Incidenza	CI 95%	Incidenza	CI 95%	
60		0,	0-17	1.71,	2.88	

**Quantificazione del rischio di PML: durata del trattamento con natalizumab, prima dell'uso di immunosoppressori e stato anticorpale anti-JCV**

Un algoritmo del rischio di PML combinato, quantitativo è stato sviluppato per i pazienti con SM trattati con natalizumab sulla base della durata del trattamento, uso precedente di immunosoppressori e stato anticorpale anti-JCV (Figura 3). Poiché l'esposizione a JCV è un requisito per la PML, i pazienti che sono negativi all'anticorpo anti-JCV rappresentano il sottogruppo di rischio inferiore nell'algoritmo di stratificazione del rischio di PML, con un rischio stimato di  $\leq 0,11$  per 1000 (CI 95%: 0-0.59), sulla base della stima conservativa determinata nell'analisi di sensibilità. Al contrario, il gruppo con rischio massimo è costituito da quei pazienti che sono positivi all'anticorpo anti-JCV, con uso precedente di immunosoppressori e che sono stati trattati con natalizumab per 25-28 mesi. Questo algoritmo presupponeva che tutti e 102 i casi confermati di PML fossero positivi all'anticorpo anti-JCV prima della diagnosi di PML. Per il sottogruppo a rischio maggiore (pazienti che avevano tutti e tre i fattori di rischio) il rischio di PML stimato era approssimativamente 7,8 per 1000 (CI 95%: 5.2-11.3). Per pazienti che erano positivi all'anticorpo anti-JCV senza uso precedente di immunosoppressori, il rischio di PML era coerente con il rischio nella popolazione globale trattata con natalizumab in punti temporali simili (Figure 1A e 1B). L'analisi della sensibilità dell'effetto della variazione delle stime usato per sviluppare il presente algoritmo ha prodotto valori minimi e massimi che erano generalmente coerenti con le stime originali viste nello

scenario del caso di base (si vedano Figure 4A e 4B). Il rischio nei pazienti negativi all'anticorpo anti-JCV era determinato presupponendo che un caso ipotetico di PML si fosse verificato in un paziente negativo all'anticorpo anti-JCV.

Questa analisi ha variato la prevalenza dell'anticorpo anti-JCV nella popolazione generale con SM dal 48% (come visto in TYGRIS-US) al 59% (come visto nel registro svedese indipendente), uso precedente di immunosoppressori nella popolazione con SM trattata con natalizumab dal 14-24% (in base alle stime USA e UE in TYGRIS, rispettivamente) e stime di esposizioni a natalizumab a 25-48 mesi dal 35-45% (in base alla stima attuale del 40% e un aumento del 10% circa nello scorso anno). I grafici rappresentano le stime puntuali e gli intervalli di confidenza del 95% per ciascuno scenario (caso base, minimo e massimo). In generale, lo scenario del caso di base era relativamente coerente con le stime minime e massime.

Poiché affinché si sviluppasse PML è necessaria la presenza di infezione da JCV, il rischio più basso di PML era determinato essere in pazienti che erano negativi all'anticorpo anti-JCV,  $\leq$  0-11 casi per 1000 pazienti trattati con natalizumab (CI 95% 0-0,59), indipendentemente da altri fattori di rischio, almeno 20 volte meno dei pazienti positivi all'anticorpo anti-JCV,  $p < 0,0001$ . Sebbene non vi siano stati casi di PML in pazienti negativi all'anticorpo anti-JCV fino a oggi, il reale rischio di sviluppare PML non può essere pari a zero perché il saggio anticorpale anti-JCV ha un tasso analitico di falsi positivi stimato tra 2,5-3,2%<sup>1,19</sup>. Al contrario, il rischio di PML era massimo in pazienti che possedevano tutti e tre i fattori di rischio (trattamento con natalizumab per 25-48 mesi, precedente uso di immunosoppressori e stato positivo all'anticorpo anti-JCV) con un'incidenza stimata di 7,8 casi per 1000 pazienti (CI 95%: 5-2-11-3).

Esempio 2. L'ELISA dell'anticorpo anti-JCV era convalidato presso laboratori clinici per dimostrare la solidità del metodo.

Un nuovo saggio di immunoassorbimento legato a un enzima a 2 fasi (ELISA) che

rileva anticorpi anti-JCV in siero o plasma umano è stato recentemente descritto (si veda PCT/US2011/020832). Le caratteristiche chiave di questo saggio includono sia il legame diretto sia componenti in competizione in soluzione; l'uso di preparazioni ben caratterizzato di particelle JC virus-simili (VLP); inclusione di campioni di controllo della qualità (QC) adeguati; 5 determinazione statistica di soglie di selezione del saggio usando un ampio numero di campioni clinici raccolti longitudinalmente; normalizzazione del segnale del saggio e rilevamento di diversi isotipi di anticorpi anti-JCV (incluse IgG, IgM, IgA e IgE).

L'ELISA dell'anticorpo anti-JCV era convalidato in tre laboratori clinici al fine di dimostrare la solidità del metodo. La convalida analitica era eseguita mediante valutazione della 10 precisione intra e inter-saggio, specificità e sensibilità analitica, interferenza della matrice, solidità e stabilità del reagente.

La stabilità degli anticorpi anti-JCV in campioni di siero e plasma era dimostrata usando campioni QC del saggio preparati da sieri umani raggruppati come anche campioni di siero e plasma da donatori singoli. Anticorpi anti-JCV erano mostrati essere stabili in siero e plasma 15 mediante 6 cicli di congelamento/scongelo e per 14 giorni quando conservati sia a temperatura ambiente (18-25 °C) e a 2-8 °C. In aggiunta, anche la stabilità di anticorpi anti-JCV in sangue intero conservato a 2-8 °C a temperatura ambiente (18-25 °C) o a 37 °C per 7 giorni, 7 giorni e 3 giorni, rispettivamente, prima della lavorazione era dimostrata usando provette di raccolta sia di siero sia di plasma. La stabilità di VLP JC era mostrata mediante 4 cicli di 20 congelamento/scongelo e per 18 mesi a 2-8 °C.

La validazione analitica dimostrava che il saggio è sensibile, specifico e preciso. La sensibilità del saggio era stimata a 1,7 ng/ml usando un controllo di anticorpo monoclonale anti-JCV umanizzato ed era stimata a 1,25 µg/ml usando un anticorpo policlonale purificato da sieri 25 positivi all'anticorpo anti-JCV. La sensibilità al rilevamento dell'infezione da JCV era stimata essere del 97,5%. La specificità del saggio nel discriminare anticorpi specifici per JCV da

anticorpi diretti contro il BK virus, un polyomavirus correlato era anch'essa dimostrata. La precisione media inter e intra-saggio era approssimativamente del 6,4% e del 12,2% per la fase di screening e del 2,6% e del 5,3% per la fase di conferma. I risultati ottenuti per il plasma e il siero erano altamente congruenti e la solidità del saggio era dimostrata dai risultati altamente concordi generati da 3 laboratori che testavano un pannello di 100 campioni in cieco.

Esempio 3. Un saggio JCV a due fasi rifinito (saggio Gen2) fornisce risultati più accurati rispetto al saggio originale (saggio Gen1).

Il saggio anticorpale anti-JCV a due fasi era modificato seguendo cicli di ottimizzazione. Il nuovo saggio differisce dal primo in almeno i modi seguenti:

- 10           •       HPVLP è usata a una concentrazione del substrato di 0,4 µg/ml su piastre nella prima fase, e in soluzione nel saggio di conferma, rispetto a 1 µg/ml usato nel saggio Gen1;
- il siero del paziente è diluito 1:101 prima di applicarlo a HPVLP su piastre nella prima fase del saggio o a HPVLP in soluzione nel saggio di conferma, rispetto a 1:200 nel saggio Gen1;
- 15           •       il reagente secondario (IgG anti-umana) coniugato a HRP è tipicamente diluito 1:20.000 (ma può necessitare di essere ri-regolato affinché i nuovi lotti corrispondano al segnale del lotto precedente) e il tempo di incubazione con il coniugato è di soli 30 minuti. Nel saggio Gen1, lo stesso reagente era diluito 1:80.000 e il tempo di incubazione era di 60 minuti;
- la reazione di legame è saggiata incubando TMB del substrato di HRP per 20  
20 minuti ± 2 minuti, mentre in Gen1 l'incubazione di TMB era per 20 minuti ± 5 minuti.
- Nel saggio di conferma, 10 µl di campione vengono aggiunti a 1 ml di tampone di conferma (diluizione 1:101) e la reazione procede per 10-20 minuti. Nel saggio Gen1, una concentrazione 2x di campione (diluizione 1:100) e HPVLP (2 µg/ml) è stata miscelata in proporzioni uguali e quindi incubata per 60 minuti.
- 25           •       Il calibratore cut-off (CO) è regolato per avere un indice di reattività di circa

nOD 1,0 e un controllo positivo (PC) è regolato per avere un indice di reattività di circa nOD 1.3). Il CO e il PC sono fatti mescolando un siero positivo all'anticorpo anti-JCV e un siero negativo all'anticorpo anti-JCV. Per il controllo negativo (NC), che è tipicamente un flacone di sieri negativi, il bersaglio dell'indice di reattività è di circa 0,1; Qualitativamente, i controlli 5 derivano da raggruppamenti differenti di siero umano, ma da una concentrazione del bersaglio del saggio, sono simili ai livelli del controllo di Gen 1.

I risultati dello studio di accordo clinico JCV Gen2 sono riassunti nella Tabella 6 *infra*. Tutti i test Gen1 erano eseguiti in un laboratorio Focus Diagnostic di riferimento (Cypress, CA) e le sedi dei test per il saggio gen2 includevano Denver (n: totale= 275; su TYSABRI®= 149; 10 mai trattati= 126); New York (n: totale= 275; su TYSABRI®= 136; mai trattati= 139); e Focus Diagnostics (n= totale 262; su TYSABRI®= 95; mai trattati= 167). L'accordo percentuale è espresso come limite minimo e massimo (Gen2/Gen1) dell'intervallo di confidenza del 96% (CI 95%: da LB a UB).

**Tabella 6. Risultati dello studio di accordo clinico JCV Gen2**

Sede del test	Totale		Pazienti in cura con TYSABRI®		Pazienti mai trattati	
	Accordo % negativo (NPA)	Accordo % positivo (PPA)	Accordo % negativo (NPA)	Accordo % positivo (PPA)	Accordo % negativo (NPA)	Accordo % positivo (PPA)
Denver	86,5% (115/133) 95% CI: dal 79,6 al 91,3%	97,2% (138/142) 95% CI: dal 93 al 98,9%	85,7% (60/70) 95% CI: dal 75,7 al 92,1%	94,9% (75/79) 95% CI: dall'87,7 al 98%	87,3% (55/63) 95% CI: dal 76,9 al 93,4%	100% (63/63) 95% CI: dal 94,3 al 100%
New York	88,8% (119/134) 95% CI: dall'82,4 al 93,1%	100% (141/141) 95% CI: dal 97,3 al 100%	89,5% (51/57) 95% CI: dal 78,9 al 95,1%	100% (79/79) 95% CI: dal 95,4 al 100%	88,3% (68/77) 95% CI: dal 79,3 al 93,7%	100% (62/62) 95% CI: dal 94,2 al 100%
Focus Diagnostics	90,2% (101/112) 95% CI: dall'83,3 al	100% (150/150) 95% CI: dal 97,5 al	87,2% (34/39) 95% CI: dal 73,3 al	100% (56/56) 95% CI: dal 93,6 al	91,8% (67/73) 95% CI: dall'83,2 al	100% (94/94) 95% CI: dal 96,1 al

  
Ing. Ines Sangiacomo  
Consulente in F.I. n° USBM-041R

Sede del test	Totale		Pazienti in cura con TYSABRI®		Pazienti mai trattati	
	Accordo % negativo (NPA)	Accordo % positivo (PPA)	Accordo % negativo (NPA)	Accordo % positivo (PPA)	Accordo % negativo (NPA)	Accordo % positivo (PPA)
	94,4%	100%	94,4%	100%	96,2%	100%

Esempio 4. Lo stato anticorpale anti-JCV può essere usato per categorizzare il rischio di PML di un paziente.

Abbiamo ipotizzato che i pazienti con anticorpi anti-JCV positivi potrebbero essere ulteriormente stratificati per il rischio di sviluppare PML sulla base di titoli anticorpali anti-JCV (nOD o indice) e avidità/affinità anticorpale anti-JCV (inibizione%). Questa ipotesi è stata derivata dall'osservazione che i pazienti che hanno un titolo anticorpale anti-JCV e l'inibizione% al di sotto di un livello predeterminato (“un punto di soglia clinico”) hanno un rischio più basso di sviluppare la PML rispetto alla popolazione positiva dell'anticorpo anti-JCV. Per determinare il rischio relativo di PML suggerito dallo stato del titolo anticorpale e dell'inibizione percentuale, i titoli anticorpali anti-JCV e l'inibizione percentuale potrebbero essere fatti prima dell'inizio di TYSABRI® (natalizumab) o quando i pazienti sono già in TYSABRI®.

Per determinare il rischio relativo di PML suggerito dallo stato del titolo anticorpale e dell'inibizione percentuale in combinazione con altri fattori di rischio, sono stati raccolti dati preesistenti da due diversi saggi di anticorpi anti-JCV (“Generation I” e “Generation II”) e analizzato. I dati preesistenti includevano informazioni sul titolo anticorpale anti-JCV espresse come “nOD” o “indice”.

Nel saggio Generation I, il 22% (77/356) dei pazienti positivi agli anticorpi anti-JCV aveva nOD > 1,0 (C-1801) e il 34% (13/38) dei pazienti con PML anticorpale positivo anti-JCV aveva nOD > 1,0 (C-1801). Pertanto, ~1,5 volte pazienti PML in più hanno un nOD > 1,0 rispetto a pazienti non PML. Questo si traduce in un rapporto del rischio di 2-3 volte associato a nOD > 1,0.

Ing. Ines Sangiacomo  
Consulente in F.I. n° USBM-041R

È stato anche osservato che il 6% dei pazienti non-PML di TYSABRI® ha una variazione > 2 volte nel titolo anticorpale anti-JCV (nOD) per i campioni longitudinali raccolti oltre i 2 anni (C-1801). Tuttavia, la maggior parte dei pazienti PML con campioni longitudinali raccolti in punti temporali informativi (> 1 anno prima della diagnosi PML e entro 6 mesi dalla diagnosi PML e alla diagnosi PML) ha mostrato un aumento > 2 volte del titolo anticorpale anti-JCV (nOD). Questo suggerisce che pazienti che non mostrano una variazione significativa nel titolo JCV nel tempo presentano un rischio inferiore di sviluppare PML.

nOD e titoli anticorpali esemplificativi sono forniti nelle Figure 5A-10B. I dati del paziente sono riepilogati nella Tabella 7.

10 Un grafico dell'analisi statistica è mostrato nella Figura 11.

L'analisi statistica ha indicato che per l'inibizione percentuale, il ~ 17% dei campioni positivi agli anticorpi sono inferiori a 0,502 e il ~0% dei campioni PML è inferiore a 0,502. Circa il 30% dei campioni positivi agli anticorpi sono meno del 70% di inibizione e il ~0% dei campioni di PML (con indice <3.0) sono meno del 70% di inibizione.

15 Tabella 7. Titoli anticorpali anti-JCV e misurazioni nOD in pazienti.

Paziente	Diagnosi	nOD o indice	Titoli
1	9 ottobre 2009	Rapporto: 1,077/0,258= ~4 volte tra il primo e il secondo test	Rapporto: 5400/600= 9 volte tra il primo e il secondo test
2	16 febbraio 2005	Considerevolmente alto (>1,0)	Considerevolmente alto (16200)
3	8 ottobre 2009	Rapporto: 0,385/0,129= ~3 volte tra il primo e il secondo test (aumentato)	Rapporto: 600/200= 3 tra il primo e il secondo test (aumentato)

Paziente	Diagnosi	nOD o indice	Titoli
4	16 febbraio 2010	Rapporto: $0,628/0,309= \sim 2$ volte tra il primo e il secondo test (aumentato)	Rapporto: $1800/600= 3$ tra il primo e il secondo test (aumentato)
5	14 giugno 2009	Nessun aumento	Nessun aumento
6	Sconosciuto	Nessun aumento	Nessun aumento
7	11 luglio 2008	Rapporto: $0,639/0,226= \sim 2,8$ tra il primo e il secondo test (aumentato)	Rapporto: $1800/200= 9$ tra il primo e il secondo test (aumentato)

Esempio di riferimento 5. Un saggio anticorpale anti-JCV analiticamente convalidato è stato introdotto nella pratica clinica per stratificare pazienti con SM per un rischio maggiore o minore di PML.

Lo scopo dello studio *infra* era valutare le variazioni del titolo anticorpale anti-JCV prima e dopo l'avvio del trattamento con natalizumab.

Il saggio anticorpale anti-JCV (Gorelik et al., Ann. Neurol. 2010) era applicato a campioni provenienti da pazienti con SM svedesi trattati con natalizumab, tra cui cinque pazienti positivi a PML. I valori di OD normalizzato (nOD) del dosaggio anticorpale anti-JCV erano studiati prima e durante il trattamento con natalizumab. Campioni positivi erano diluiti in 1:3 fasi di diluizione per determinare i livelli del titolo. Una percentuale degli stessi pazienti era inoltre testata per gli anticorpi verso un antigene del citomegalovirus (CMV) umano nucleare (Schmitz et al., J. Clin. Microbiol. 1977), e per anticorpi verso l'antigene della glicoproteina E di varicella-zoster (VZV) (Thomsson, J. Virol. Methods 2011).

Tabella 8. Pazienti sottoposti a test per anticorpi anti-JCV.

<b>Caratteristiche</b>	<b>Donna</b>	<b>Uomo</b>	<b>Tutti</b>
Pazienti (n, %)	603 (70%)	258 (30%)	861
Età (mediana, intervallo)	37 (13-60)	36 (12-63)	36 (12-63)
Tempo tra campionamento appaiato (mediana, intervallo)	12 (1-38)	12 (1-36)	12 (1-38)
Pazienti con tempo trascorso tra campionamento appaiato da 1 a 8 mesi (n, % di tutti i pazienti)			244 (28%)
Pazienti con tempo trascorso tra campionamento appaiato da 8 a 18 mesi (n, % di tutti i pazienti)			296 (34%)
Pazienti con tempo trascorso tra campionamento appaiato >18 mesi (n, % di tutti i pazienti)			321 (37%)

Dopo l'inizio del trattamento con natalizumab, i livelli di anticorpi anti-JCV sono rimasti relativamente stabili con un lieve declino dei livelli di NOD osservati nei pazienti positivi all'anti-JCV. L'apparente diminuzione dei livelli di anticorpi anti-JCV (nOD) è stata osservata quando i pazienti erano in trattamento con natalizumab (n = 471), ma non durante la precedente terapia con interferone beta (n = 210). Ciò indica un potenziale effetto della terapia con natalizumab sui livelli di anticorpi anti-JCV, senza influenzare significativamente lo stato sierologico e il tasso di sieropositività (pre: 56%; post 55%).

Dopo l'inizio del trattamento con natalizumab, i livelli di anticorpi anti-VZV (OD) (n = 715), ma non quelli anti-CMV (n = 502) sono diminuiti leggermente.

Per i 5 pazienti che hanno sviluppato PML, la variazione osservata nei livelli di anticorpi anti-JCV (nOD) nel siero è riepilogata nella Tabella 9 *infra*. I livelli di anticorpi anti-JCV (nOD) nel siero aumentavano al momento della diagnosi di PML rispetto ai valori al basale.

15 Tabella 9. Variazione in nOD durante il trattamento con natalizumab

Paziente con PML	Mesi di trattamento con natalizumab prima della diagnosi di PML	$\Delta$ nOD tra il tempo di inizio del trattamento con natalizumab e tempo alla diagnosi di PML
1	-25	0,348
2	-29	0,284
3	-34	0,190
4	-49	0,932
5	-25	0,175

Da questo studio abbiamo concluso che la terapia con natalizumab può portare a una lieve diminuzione dei livelli di anticorpi anti-JCV (nOD) senza influenzare il tasso di sieropositività JCV. In particolare, solo il 5% della popolazione di riferimento positiva anti-JCV ha dimostrato una variazione nei valori di NOD ( $\Delta$ nOD) sopra 0,151 (95% -percentile), mentre questo è stato osservato in tutti i 5 casi svedesi di PML al momento della diagnosi rispetto al valori di base. Pertanto, l'indagine di un aumento dei livelli di anticorpi anti-JCV durante la terapia con natalizumab, prima della diagnosi di PML, nel contesto della stratificazione del rischio di PML è giustificata.

Esempio 6. Uso di un cut-off clinico distinto da un cut-off analitico per delineare i gruppi ad alto e basso rischio tra pazienti positivi all'anticorpo anti-JCV.

I risultati dello studio Stratify I sono stati usati per determinare un cut-off clinico distinto da un cut-off analitico per delineare i gruppi ad alto e basso rischio tra pazienti positivi all'anticorpo anti-JCV. Pertanto, il rischio di PML per un paziente si basa inizialmente su livelli del titolo anticorpale anti-JCV al basale. Il dosaggio anticorpale anti-JCV Generation II era usato in questo studio.

Pazienti non PML trattati con TYSABRI® (Stratify I, n= 1044) e pazienti con PML (> 6 mesi prima della diagnosi di PML (n= 38) sono stati valutati (Figura 12). Nel dosaggio Generation II, il 17% dei pazienti positivi agli anticorpi anti-JCV aveva titoli (indice) inferiori al titolo più basso (indice) osservato per i campioni di pazienti con PML raccolti > 6 mesi prima

della diagnosi PML, suggerendo che quei pazienti potevano avere un rischio inferiore per lo sviluppo di PML (come i pazienti negativi agli anticorpi anti-JCV). In aggiunta, il 50% di pazienti positivi agli anticorpi anti-JCV aveva titoli (indice) al di sotto dell'indice 1,5, rispetto a solo il 13% di pazienti PML da cui erano stati raccolti campioni >6 mesi prima della diagnosi di PML avevano indice <1,5. Inoltre, solo il 4,4% dei pazienti con PML che non hanno precedentemente ricevuto agenti immunosoppressori ha presentato campioni con indice <1,5, suggerendo che quei pazienti potrebbero avere un rischio più basso di sviluppare la PML rispetto ai pazienti con alto titolo anticorpale anti-JCV (nOD o indice).

I pazienti con un nOD <0,5 (109/1044 (10,4% dei campioni totali) o 109/549 [20% dei pazienti positivi agli anticorpi anti-JCV]) sono stati determinati essere nel gruppo con rischio di PML più basso (potenzialmente tanto basso quanto i pazienti negativi agli anticorpi anti-JCV), poiché nessun paziente con PML ha avuto un indice <0,5. I pazienti con indice > 0,5 ma <1,5 sono stati determinati essere nella zona a basso rischio, in quanto il 50% dei pazienti positivi agli anticorpi anti-JCV non-PML e solo il 13% dei pazienti PML, rispettivamente, aveva campioni in questa zona. In aggiunta, solo il 4% di pazienti PML che non erano noti per avere ricevuto precedenti terapie con immunosoppressori aveva campioni con indice <1,5 (Figura 13). I pazienti con un indice > 1,5 (271/549 (50%) della popolazione positiva agli anticorpi anti-JCV) sono stati determinati avere un rischio più elevato di PML. Il quarantasette per cento di pazienti era negativo agli anticorpi anti-JCV.

Nella diagnosi post-PML, i pazienti sono sottoposti a immunoassorbimento (IA) o scambio plasmatico (PLEX) per rimuovere natalizumab circolante e per ripristinare la funzione immunitaria. I livelli di anticorpi anti-JCV sono rapidamente ripristinati ai livelli precedenti alla procedura in questi pazienti.

Esempio 7. Metodologia statistica proposta per assegnare rischi stratificati a pazienti con sclerosi multipla (SM) trattati con TYSABRI® che siano già risultati positivi agli anticorpi anti-

JCV nel dosaggio anti-JCV a due fasi descritta nel presente.

Per lo studio STRATIFY-II (American Academy of Neurology (AAN) Meeting, aprile 21-28 2012, abstract S041.002) vengono valutate due strategie alternative (denominate Strategy 1 e 2) per assegnare il rischio di PML a sieropositivi anti-JCV. Strategy-1, il più conservativo  
5 dei due metodi, è un affinamento di una delle regioni di tolleranza bivariate non parametriche fornite nel rapporto allegato. Strategy-2, la cui metodologia statistica è delineata *infra*, deve assegnare una proporzione maggiore di sieropositivi anti-JCV futuri al basso rischio di sviluppare PML rispetto alla Strategy-1.

Strategy-2 elabora una regione di tolleranza simultanea inferiore attorno a un'equazione  
10 adattata che misura l'inibizione % rispetto all'indice per un campione di paziente PML. Mentre Strategy-1 prevede una regione a basso rischio sulla base dell'inibizione %/misurazioni dell'indice dai pazienti del dosaggio anti-JCV a due fasi in STRATA (Ann. Neurol., 68:295-303, 2010) e STRATIFY-I (Ann. Neurol., 70:742-750, 2011) (per quasi tutti i quali si presuppone un rischio molto basso di sviluppare PML), Strategy-2 prevede una regione ad alto  
15 rischio sulla base di misurazioni raccolte da pazienti SM prima della loro data di diagnosi di PML. Sebbene la nostra raccolta limitata di campioni di PML possa non essere rappresentativa dell'intero universo di pazienti con SM trattati con Tysabri affetti da PML, Strategy-2 presume che la relazione tra inibizione % vs indice in questi campioni sia rappresentativa dell'universo PML prima della diagnosi. Questa ipotesi era statisticamente supportata da dati PML anti-JCV  
20 che mostravano una relazione inibizione % vs indice parallela a quella di STRATIFY-1 + STRATA. È questo parallelismo che è stato sfruttato da Strategy-2 per modellare la relazione di PML tra inibizione % e indice.

La relazione tra inibizione % e indice è innanzitutto modellata statisticamente per il set combinato di campioni STRATIFY-1/STRATA/PML. L'equazione adattata per inibizione % e  
25 indice distingue tra campioni PML e STRATIFY-1/STRATA. Una regione di tolleranza

simultanea inferiore del 95% o del 99% è quindi costruita attorno all'equazione adattata vincolata per i campioni PML. I futuri sieropositivi anti-JCV con misurazioni di inibizione %/indice che rientrano in questa regione di tolleranza hanno un rischio più elevato di sviluppare la PML; questa regione di tolleranza deve garantire che almeno il 95% (o il 99%) dei  
5 campioni di pazienti PML prima della diagnosi sia assegnato a un rischio più elevato. Si noti che campioni futuri con misurazioni dell'indice >2,5 sono automaticamente assegnati a un rischio maggiore di sviluppare PML.

Dettagli statistici. Il seguente modello misto (o un certo suo affinamento) è innanzitutto adattato usando la procedura SAS MIXED per un set combinato di misurazioni campione di  
10 PML STRATIFY-1 + STRATA + anti-JCV Gen-2 inibizione %/indice.

$$Y_{ij} = \beta_0 + \delta \times W + \beta_1 \times X^+ + \beta_{11} \times X^+ \times X^+ + \pi_i + \varepsilon_{ij}$$

(1)

Dove

Y (o log-ratio) =  $-\log_e\{1 - \text{inibizione \%}/100\}$ ;

15  $X^+ =$  indice se indice  $< x_0$   
 $= x_0$  per  $x_0 \leq$  indice  $\leq 2,5$ ;

W=0 se il campione è stato raccolto da un paziente STRATIFY-1 o STRATA

=1 se il campione è stato raccolto da un paziente PML prima della diagnosi;

$\pi_i$  = effetto casuale per il paziente i;

20  $\varepsilon_{ij}$  = misurazione del saggio casuale + errore longitudinale per n punto temporale del paziente i;

$\varepsilon_{ij}$  sono presupposti normalmente e indipendentemente distribuiti con media pari a zero e varianza  $\sigma^2$ ;  $\pi_i$  sono presupposti normalmente e indipendentemente distribuiti con media pari a zero e varianza  $\sigma_p^2$ ;  $\varepsilon_{ij}$  e  $\pi_i$  sono presupposti indipendenti. Pertanto, per il modello misto  
25 nell'equazione (1),  $X^+$  e W sono effetti fissi, mentre  $\pi_i$  e  $\varepsilon_{ij}$  sono effetti casuali. Una stima

preliminare di  $x_0$  era 1,77, ma deve essere affinata. Una regione di tolleranza simultanea inferiore al 95 o 99% attorno all'equazione adeguata viene costruita (riferimenti 1-5). I limiti inferiori della regione di tolleranza come funzione del livello di indice sono quindi ritrasformati in inibizione %. Campioni futuri le cui misurazioni di inibizione %/indice rientrano nella regione di tolleranza o hanno misurazioni dell'indice  $>2,5$  sono ritenuti a rischio maggiore di sviluppare PML.

La Tabella 10 *infra* fornisce percentuali stimate di positivi agli anticorpi anti-JCV che sono classificati a rischio inferiore sulla base di nOD diversi.

Tabella 10. Percentuali stimate di positivi agli anticorpi anti-JCV che sono classificati a rischio

10 inferiore sulla base di nOD diversi.

Regola per la misurazione dell'indice per l'assegnazione a un rischio inferiore di PML	Percentuale empirica di sieropositivi STRATIFY-1 non PML assegnati a rischio inferiore di sviluppare PML	Percentuale stimata di futuri sieropositivi non PML assegnati a rischio inferiore di PML con confidenza del 95%	Percentuale stimata di sieropositivi pre-PML classificati erroneamente a rischio inferiore di PML (sulla base della distribuzione di Weibull adeguata a 39 campioni di pazienti indipendenti raccolti prima della diagnosi)**	Percentuale stimata di sieropositivi futuri pre-PML classificati erroneamente a rischio inferiore di PML (con certezza di confidenza del 95%)	Percentuale empirica di raccolta interna di sieropositivi pre-PML classificati erroneamente a rischio inferiore di PML*
$\leq 0,40$	11,1% (66/595)	$\geq 9,2\%$	0,4%	$\leq 1,2\%$	0% (0/153)
$\leq 0,50$	16,0% (95/595)	$\geq 13,7\%$	0,8%	$\leq 2,0\%$	0,65% (1/153)
$\leq 0,65$	22,7% (135/595)	$\geq 20,0\%$	1,7%	$\leq 3,6\%$	4,58% (7/153)
$\leq 0,70$	25,2% (205/595)	$\geq 22,5\%$	2,0%	$\leq 4,2\%$	4,58% (7/153)

Ing. Ines Sangiacomo  
Consulente in F.I. n° USBM-041R

Regola per la misurazione dell'indice per l'assegnazione a un rischio inferiore di PML	Percentuale empirica di sieropositivi STRATIFY-1 non PML assegnati a rischio inferiore di sviluppare PML	Percentuale stimata di futuri sieropositivi non PML assegnati a rischio inferiore di PML con confidenza del 95%	Percentuale stimata di sieropositivi pre-PML classificati erroneamente a rischio inferiore di PML (sulla base della distribuzione di Weibull adeguata a 39 campioni di pazienti indipendenti raccolti prima della diagnosi)**	Percentuale stimata di sieropositivi futuri pre-PML classificati erroneamente a rischio inferiore di PML (con certezza di confidenza del 95%)	Percentuale empirica di raccolta interna di sieropositivi pre-PML classificati erroneamente a rischio inferiore di PML*
≤0,75	25,7% (153/595)	≥22,9%	2,4%	≤5,0%	8,50% (13/153)
≤1,00	34,5% (205/595)	≥31,4%	5,4%	≤9,6%	11,76% (18/153)
≤1,25	41,0% (244/595)	≥37,8%	9,7%	≤15,7%	15,69% (24/153)
≤1,50	46,9% (279/595)	≥43,6%	15,6%	≤22,2% %	22,22% (34/153)

\*Stime distorte di popolazione pre-PML a causa di numeri multipli e uguali di misurazioni tra i pazienti donatori.

\*\*Adeguamento stimato sulla base di una media di 1000 simulazioni dove era stato casualmente scelto 1 punto temporale per paziente pre-PML.

### **Rivendicazioni**

**1.** Metodo per valutare il rischio di un paziente di sviluppare leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML), il metodo comprendendo:

i) determinare, in un campione di siero o plasma del paziente, un titolo anticorpale anti-JC virus (JCV), in cui il titolo anticorpale anti-JCV viene determinato mediante un saggio ELISA comprendente le seguenti fasi:

(a) formare una miscela di reazione comprendente un'aliquota di campione e un substrato su cui vengono disposte le particelle virus-simili altamente purificate (HPVLP), e

(b) rilevare il livello di anticorpo anti-JCV legato a detto substrato su cui vengono disposte le HPVLP;

in cui il titolo anticorpale anti-JCV viene espresso come un valore indice, in cui il valore indice viene determinato dalla normalizzazione di un valore di densità ottica (OD) del campione a un calibratore di cut-off, regolato per avere una nOD di 1, e un controllo positivo viene regolato per avere un nOD di 1,3; in cui il calibratore di cut-off e il controllo positivo comprendono una miscela di siero positivo per anticorpi anti-JCV e siero negativo per anticorpi anti-JCV,

e in cui un controllo negativo comprende un siero negativo anticorpale anti-JCV e ha una nOD di 0,1;

e

ii) determinare il paziente che è a elevato rischio di sviluppare PML; se viene determinato che il valore indice anticorpale anti-JCV è  $>1,5$ .

**2.** Il metodo della Rivendicazione 1, in cui

Il titolo anticorpale anti-JCV viene espresso come valore indice per una prima miscela di reazione comprendente una prima aliquota del campione di siero o plasma del paziente e un substrato su cui viene disposta HPVLP; e

  
Ing. Ines Sangiacomo  
Consulente in F.I. n° USBM-041R

In una seconda fase, una % di inibizione indicativa di un grado a cui l'incubazione con HPVLP in fase solubile riduce un livello di anticorpo anti-JCV non legato che si lega a HPVLP disposto su un substrato rispetto alla prima miscela di reazione viene determinata in una seconda miscela di reazione comprendente una seconda aliquota del campione di siero o plasma del paziente e un substrato su cui viene disposta HPVLP; e

Determinare il paziente a elevato rischio di sviluppare PML, se il valore indice anticorpale anti-JCV viene determinato essere  $>1,5$  e la % di inibizione viene determinata essere  $>70\%$ .

3. Il metodo secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 2, in cui il titolo anticorpale anti-JCV o la % di inibizione viene determinata prima di una somministrazione di natalizumab.
4. Il metodo di una qualsiasi delle Rivendicazioni 1-3, in cui il titolo anticorpale anti-JCV o la % di inibizione viene determinata dopo che il paziente ha iniziato un trattamento con natalizumab.
5. Il metodo di una qualsiasi delle Rivendicazioni 1-4, comprendente inoltre:
  - (a) determinare se il paziente ha ricevuto trattamento con natalizumab per più di 24 mesi; o
  - (b) determinare se il paziente abbia ricevuto una terapia immunosoppressiva non-anti-VLA-4, in cui la terapia immunosoppressiva non-anti-VLA-4 è scelta tra mitoxantrone, metotrexato, azatioprina, ciclofosfamide, micofenolato, terapia anti-CD20, terapia anti-CD11a e mofetile micofenolato;.
6. Il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui il titolo anticorpale anti-JCV o la % di inibizione viene ritestato/a a intervalli di 6 mesi o 12 mesi
7. Il metodo secondo la rivendicazione 6, in cui un aumento del titolo anticorpale anti-JCV o la % di inibizione indica un aumento del rischio del paziente di sviluppare PML
8. Il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni a 1 a 7 in cui il paziente è affetto da sclerosi multipla
9. Il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8, in cui si determina che il

paziente è a elevato rischio di sviluppare PML se il paziente ha ricevuto natalizumab per più di 24 mesi e non ha precedentemente ricevuto una terapia immunosopressiva non-anti-VLA-4, in cui la terapia immunosopressiva non-anti-VLA-4 viene scelta da mitoxantrone, metotrexato, azatioprina, ciclofosfamide, micofenolato, terapia con anti-CD20, terapia con anti-CD11a e micofenolato mofetile.

\* \* \* \*

Seguono n° 14 tavole di disegno.

Si dichiara che la presente traduzione è conforme al testo originale in lingua inglese.

Brescia, 22/02/2023

In Fede,

  
Ing. Ines Sangiacomo  
Consulente in F.I. n° USBM-041R

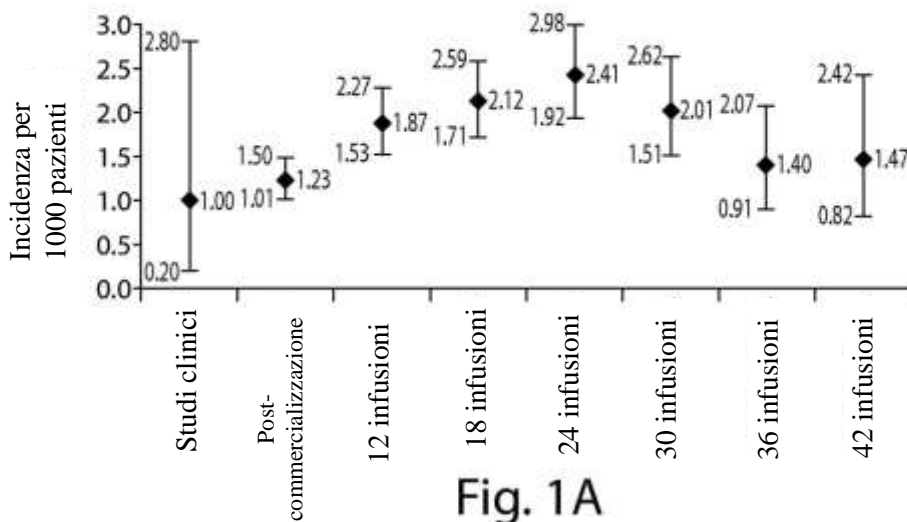


Fig. 1A

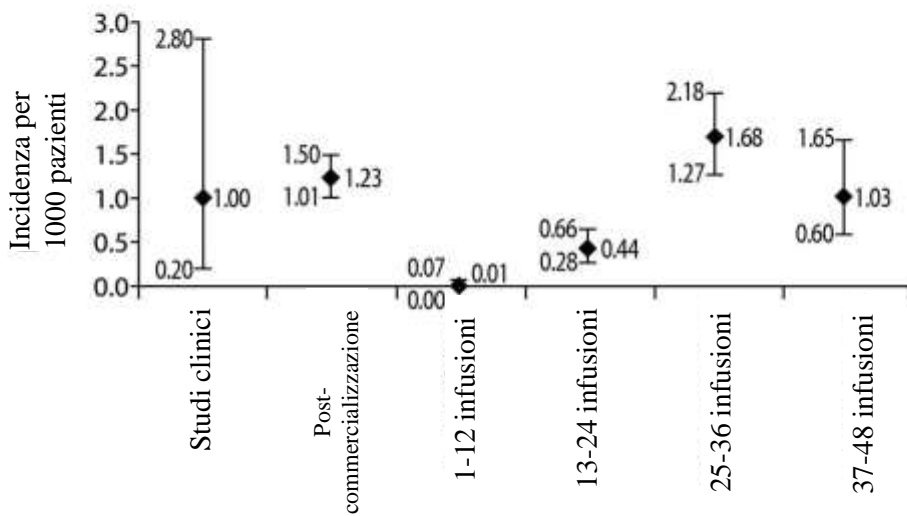


Fig. 1B

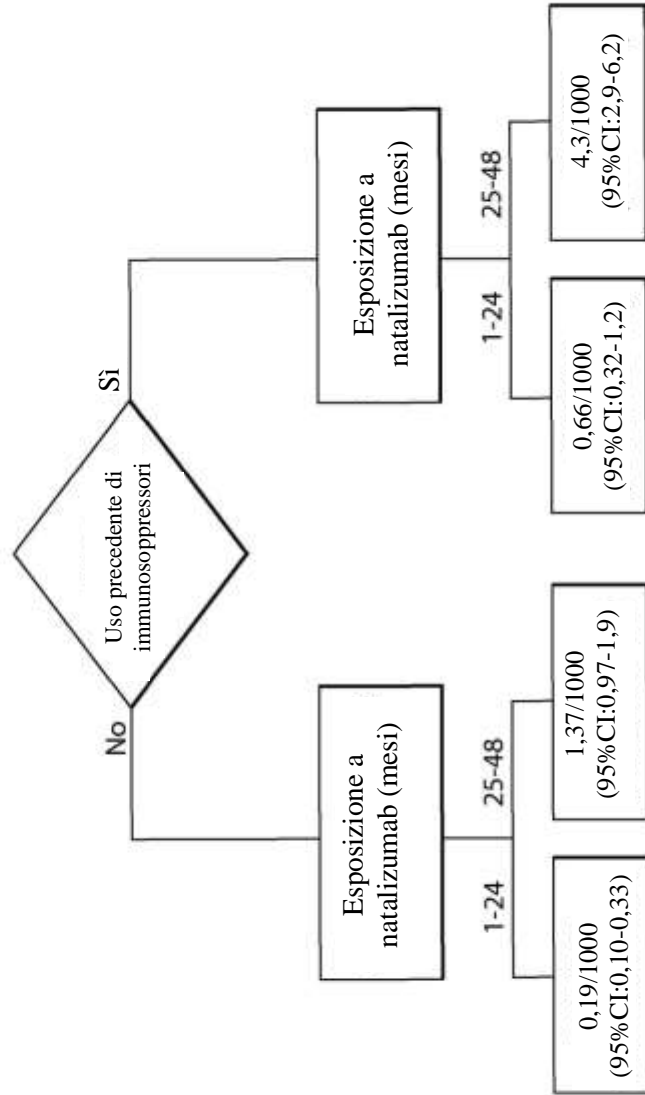


Fig. 2

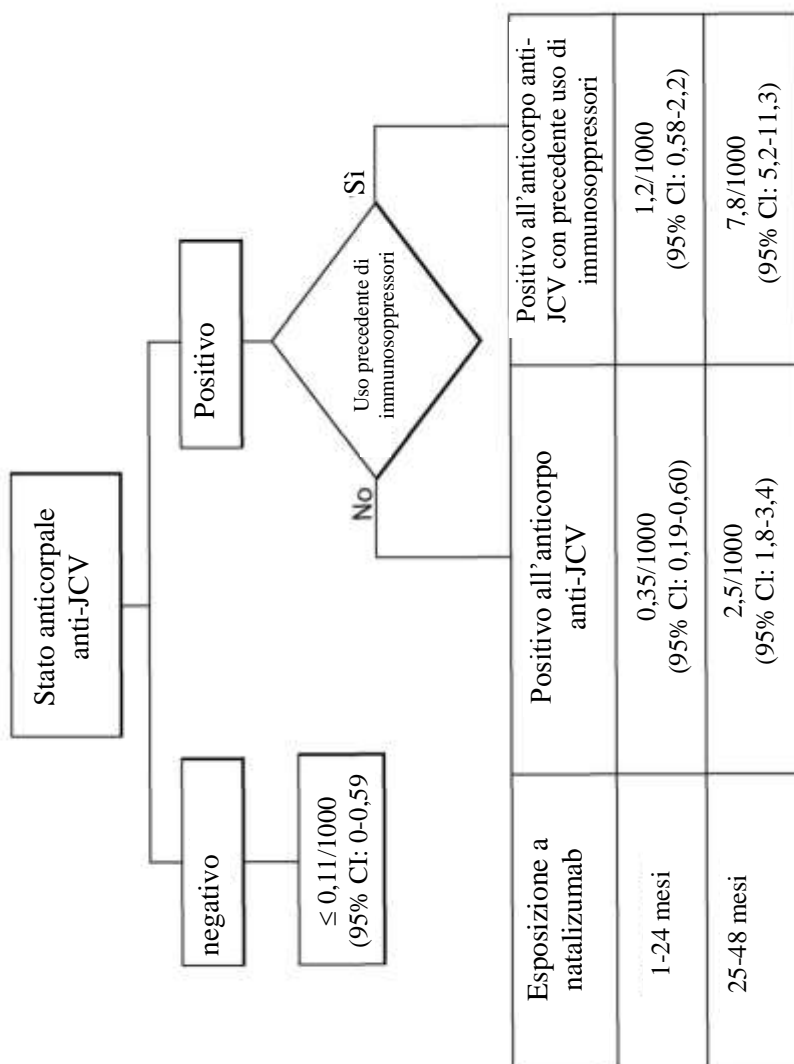
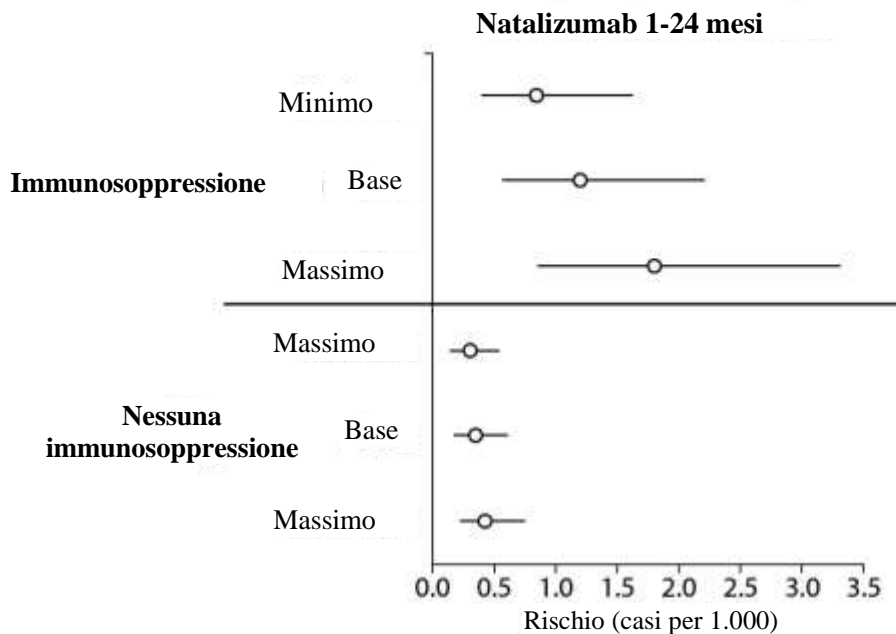
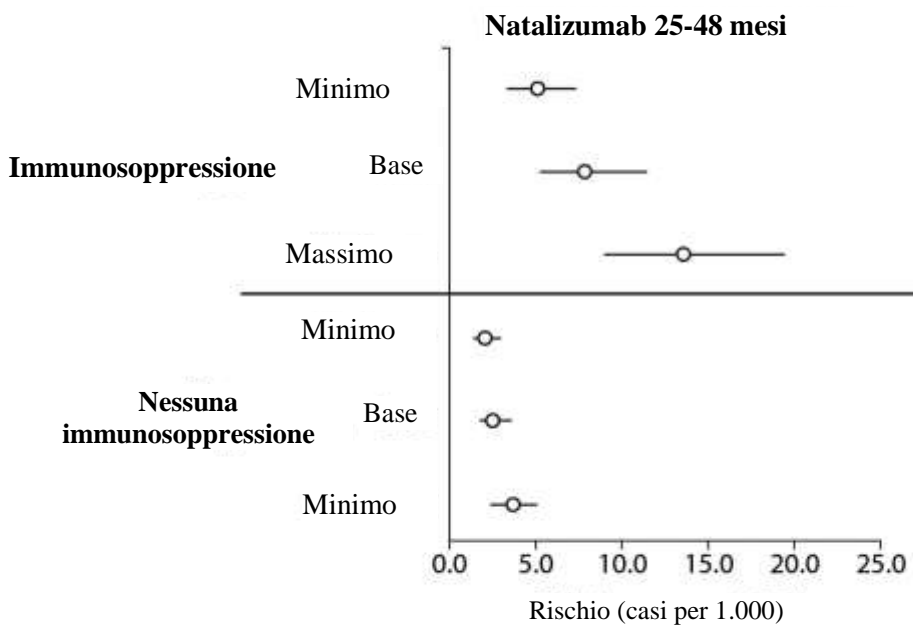


Fig. 3



**Fig. 4A**



**Fig. 4B**

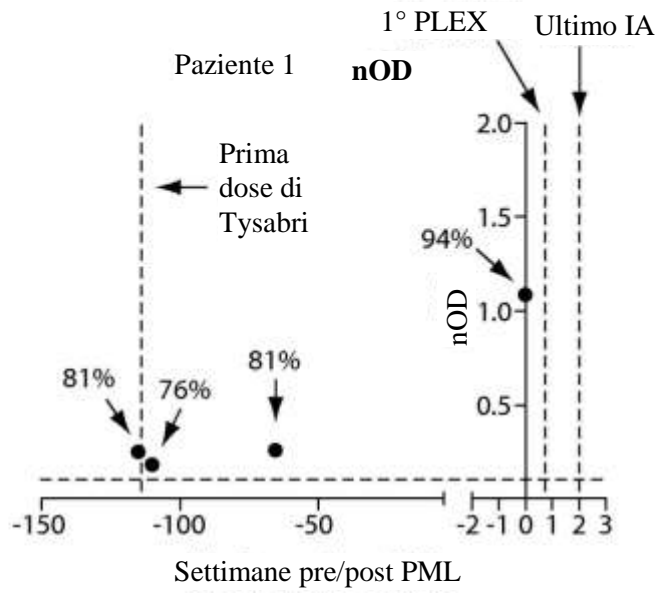


Fig. 5A

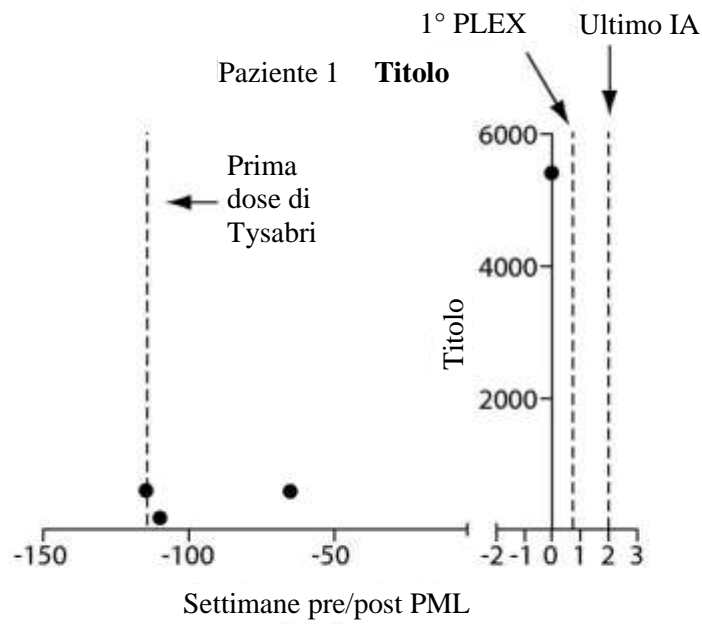


Fig. 5B

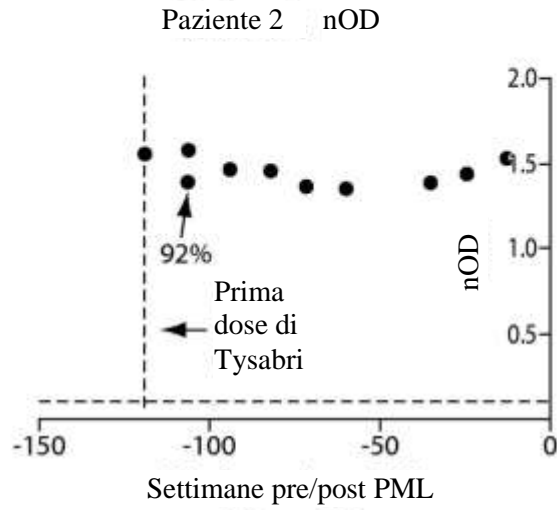


Fig. 6A

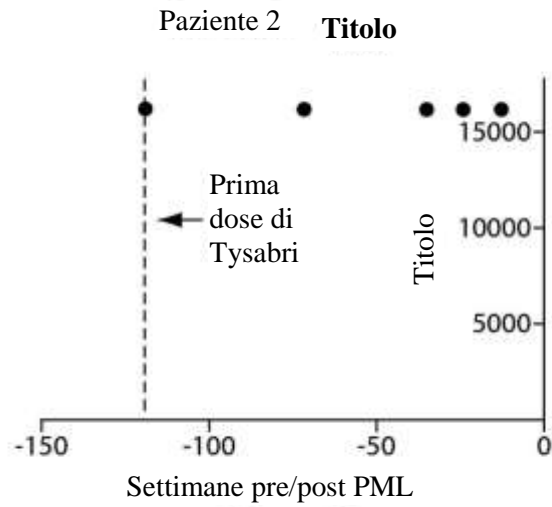


Fig. 6B

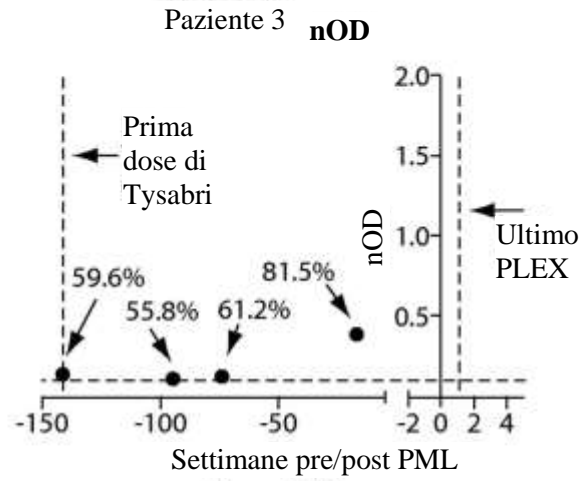


Fig. 7A

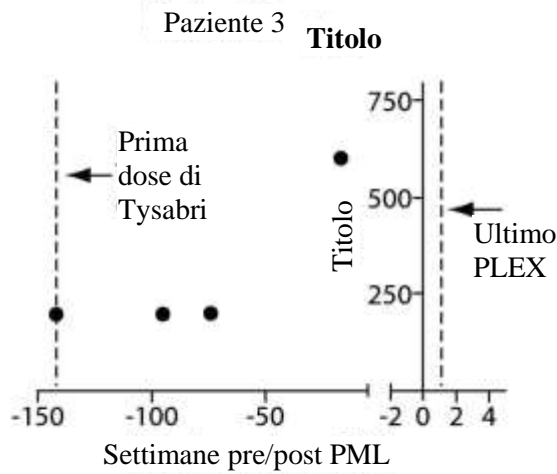


Fig. 7B

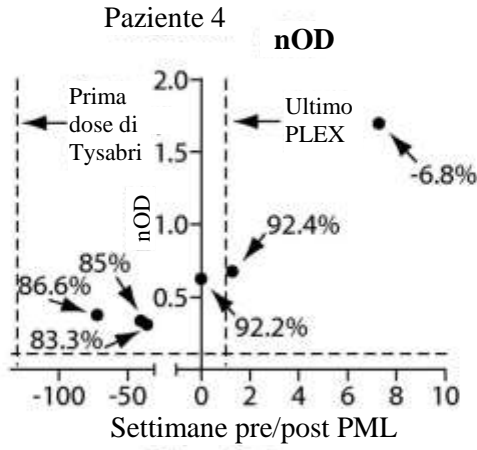


Fig. 8A

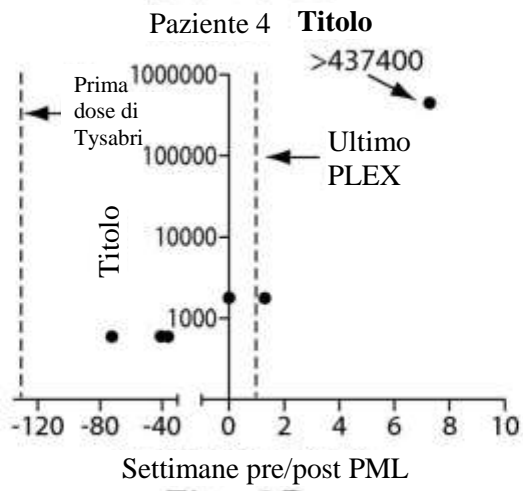


Fig. 8B

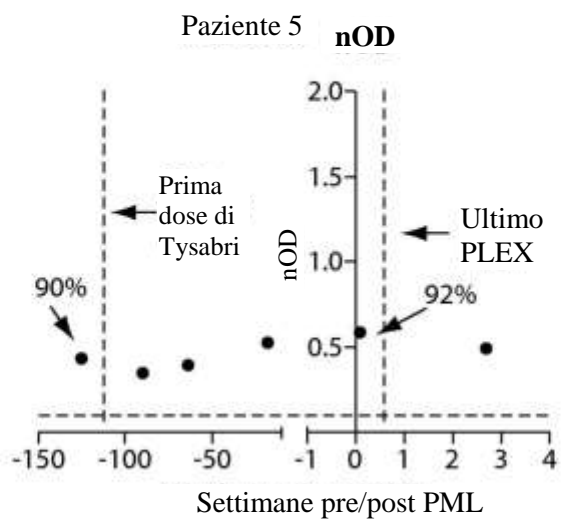


Fig. 9A

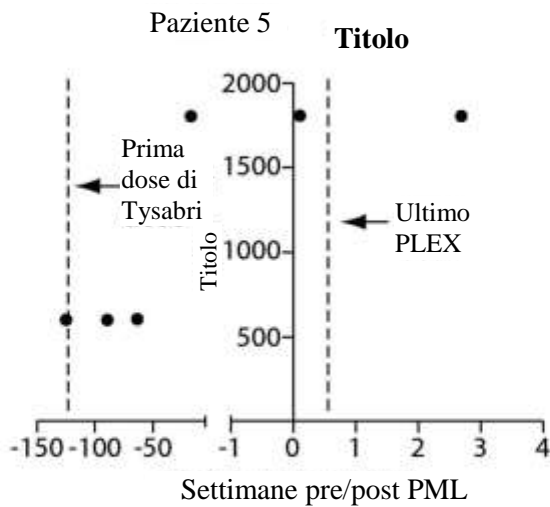


Fig. 9B

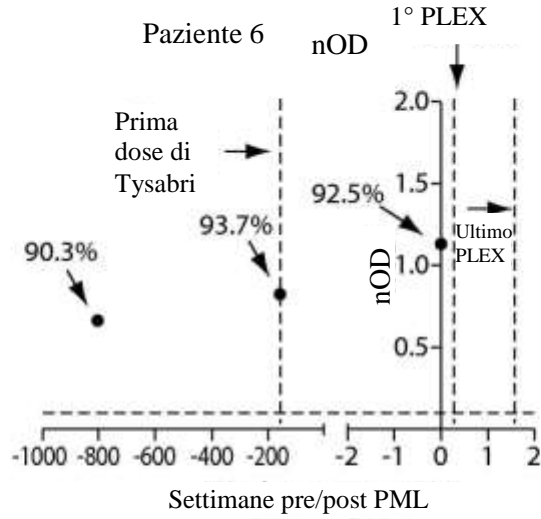


Fig. 9C

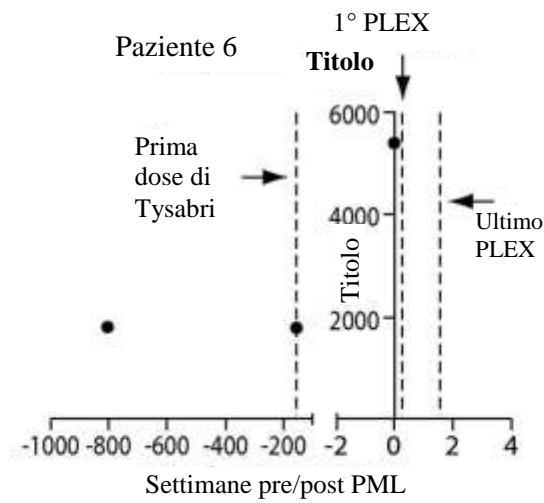


Fig. 9D

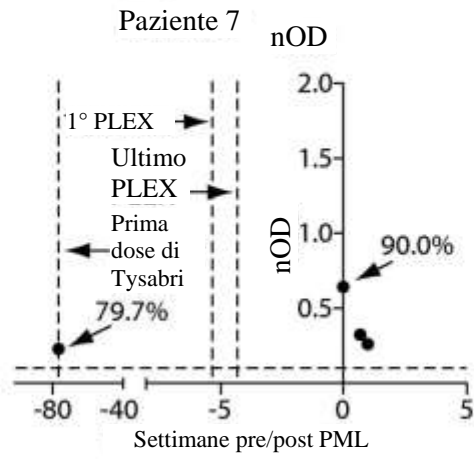


Fig. 10A

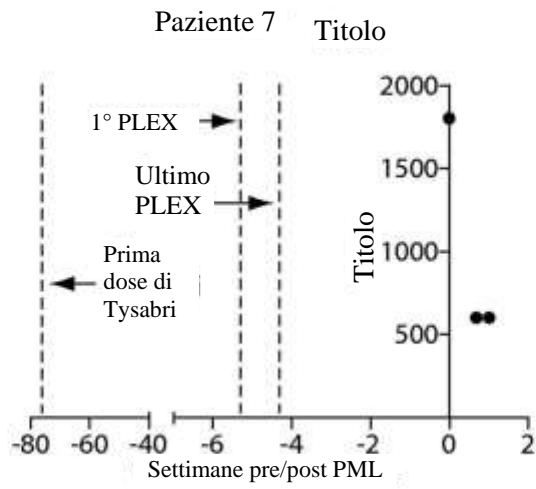


Fig. 10B

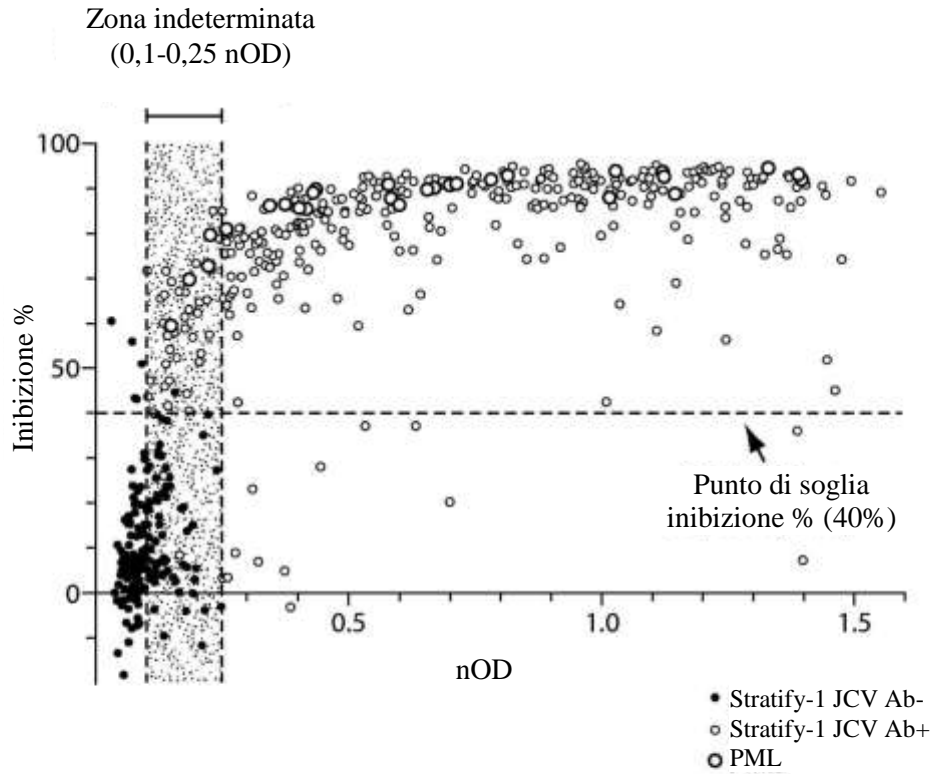


Fig. 11

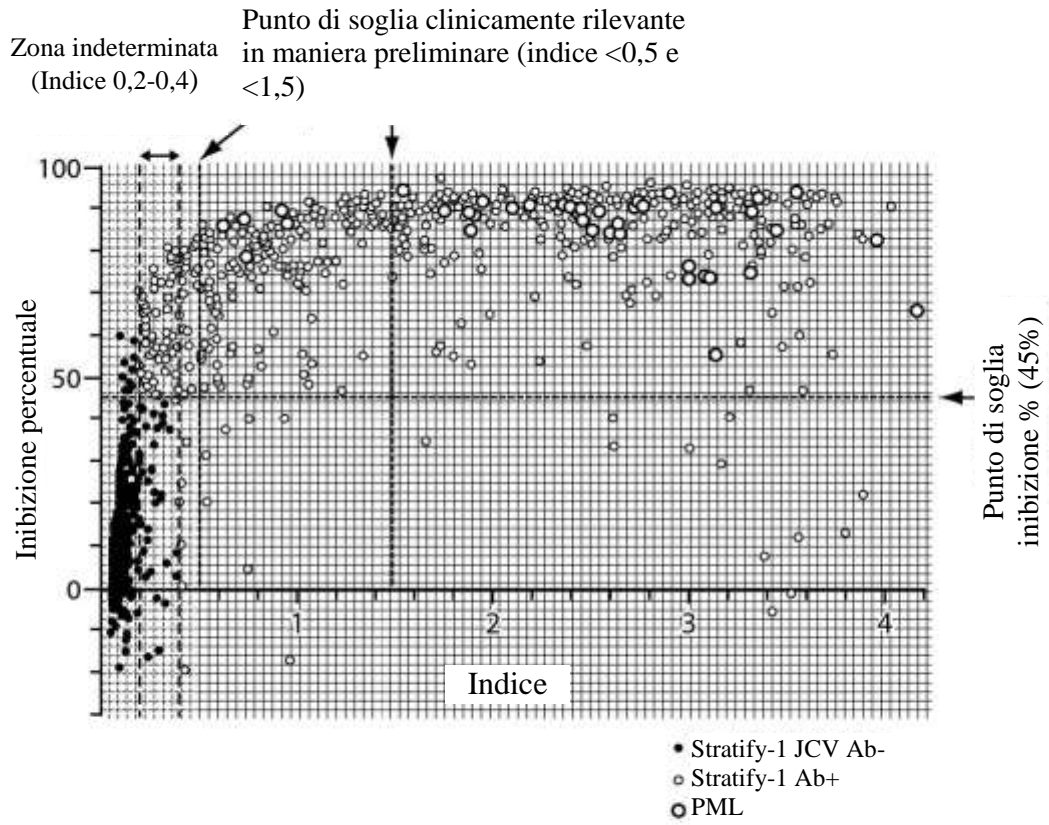
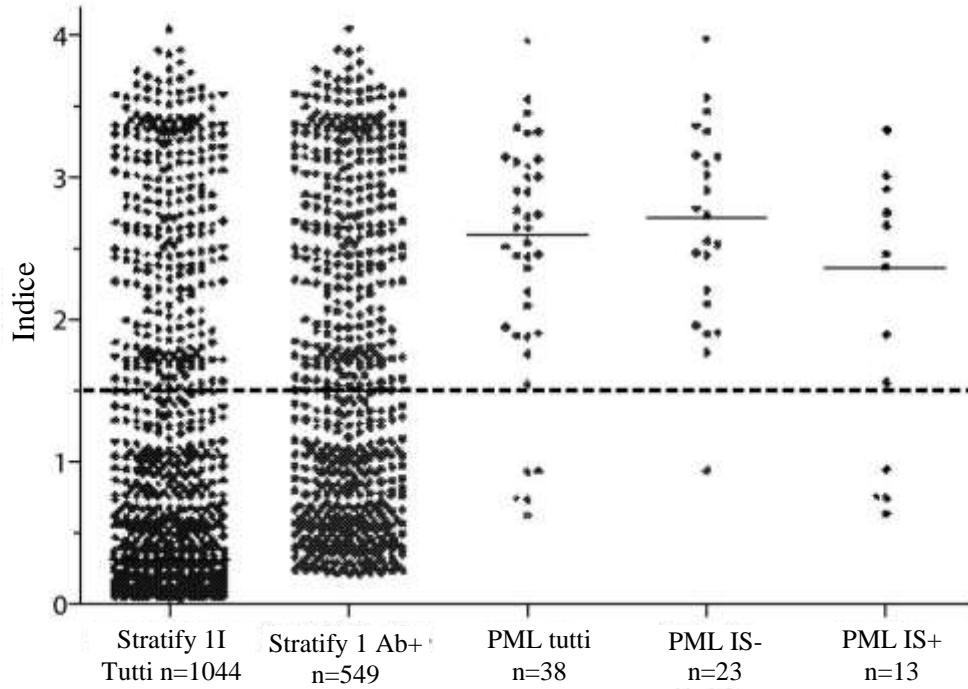


Fig. 12



Il 50% (278/549) di pazienti Ab+ ha un indice <1,5  
Il 4,4% (1/23) di pazienti PML IS- ha un indice <1,5

Fig. 13