

TRADUZIONE

Brevetto Europeo n° EP 4 152 004

Domanda di Brevetto Europeo n°22191259.5

Depositata in data 11 Gennaio 2011

5 Titolo: **“SAGGIO PER ANTICORPI DEL VIRUS JC”**

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

DESCRIZIONE

10 **DOMANDE DI BREVETTO CORRELATE**

La presente domanda di brevetto rivendica il vantaggio della Domanda di brevetto provvisoria U.S. n. 61/294,048 depositata l'11 gennaio 2010 e della Domanda di brevetto provvisoria U.S. n. 61/316,193 depositata il 22 marzo 2010.

CAMPO DELL'INVENZIONE

15 L'invenzione si riferisce a metodi per analizzare campioni per la presenza di anticorpi del virus JC.

CONTESTO

La leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML) è un'infezione opportunistica del sistema nervoso centrale (SNC) associata all'esposizione al virus JC (JCV), un virus polioma
20 che si ritiene sia patogeno nell'uomo solo in condizioni di persistente soppressione immunitaria o modulazione immunitaria. Sebbene la presenza del JCV sia necessaria per lo sviluppo della PML, si ritiene che il rischio di PML sia associato, in un modo non ben compreso, alla convergenza di molteplici fattori virali e correlati all'ospite che causano la patogenicità del virus
Major, "Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in Patients on Immunomodulatory
25 Therapies" Annu. Rev. Med. 61:35-47 (2010) [31 Ago 2009, Epub prima della stampa]). Studi

pubblicati che riportano la prevalenza dell'infezione da JCV nella popolazione umana sono vari. Queste informazioni si basano su vari tipi di studi, tra cui l'analisi PCR per DNA virale e il rilevamento di anticorpi anti-JCV. Nonostante la prevalenza del JCV nella popolazione, l'infezione da JCV raramente si traduce in PML, anche in individui con immunosoppressione

5 documentata.

Rapporti pubblicati sul rilevamento del DNA di JCV suggeriscono che il metodo sia insensibile e di uso limitato per valutare l'esposizione a JCV, poiché il DNA di JCV è stato rilevato raramente e in modo incoerente nelle cellule mononucleate di plasma, siero o sangue periferico di pazienti con PML infetti da JCV. Il rilevamento di anticorpi anti-JCV sembra

10 essere un marcatore più sensibile dell'infezione da JCV; tuttavia, i risultati riportati sono variabili. Nel 1973, Padgett e Walker hanno pubblicato uno studio che riportava una sieroprevalenza di JCV del 65-84% utilizzando un saggio di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) (Padgett e Walker, "Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, in isolates from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy" J. Infect. Dis. 127:467-70, 1973).

15 Rapporti successivi dei tassi di sieroprevalenza di JCV utilizzando il saggio HI o ELISA variavano tra il 33 e il 91%. I tassi variabili di sieroprevalenza tra questi studi sono probabilmente dovuti a marcate differenze nelle dimensioni e nei dati demografici degli studi e, forse più importante, alle differenze nei metodi di analisi.

È quindi auspicabile implementare un saggio affidabile e sensibile per determinare la

20 presenza di anticorpi anti-JCV che possa essere utilizzato, ad esempio, per valutare se un individuo sia stato esposto a JCV.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

L'invenzione si riferisce allo sviluppo di un saggio sensibile validato analiticamente per rilevare la presenza di anticorpi anti-JCV in un fluido biologico, *ad esempio* siero o plasma.

25 L'ambito dell'invenzione è definito dalle rivendicazioni allegate. Le forme di realizzazione, le

divulgazioni, gli aspetti, le istanze e le descrizioni che non rientrano più nell'ambito delle rivendicazioni allegate sono considerate semplicemente come esempi idonei a comprendere l'invenzione.

La presente invenzione è un metodo in vitro per identificare un soggetto a rischio di
5 sviluppare leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML) comprendente un saggio primario
e secondario; in cui il saggio primario comprende: (a) la messa a contatto di un campione
biologico ottenuto da un soggetto con particelle VP1 altamente purificate (HPVLP), costituite
prevalentemente dalla proteina VP1 del JCV, immobilizzate su un substrato solido in condizioni
adatte a legare un anticorpo del virus JC (JCV) nel campione a un HPVLP; (b) il rilevamento
10 del livello di legame dell'anticorpo JCV nel campione a HPVLP; e (c) la correlazione del livello
rilevato con un livello di riferimento derivato da un campione di controllo o da un set di
campioni che viene elaborato con il campione del soggetto; e in cui il saggio secondario
comprende: (a) la messa a contatto di una porzione del campione biologico ottenuto da un
soggetto con particelle virali altamente purificate (HPVLP), costituite prevalentemente dalla
15 proteina VP1 del JCV, in soluzione in condizioni adatte al legame di un anticorpo JCV nel
campione a un HPVLP, fornendo così un campione preincubato; (b) la messa a contatto del
campione preincubato con HPVLP, costituite prevalentemente dalla proteina VP1 del JCV,
immobilizzate su un substrato solido in condizioni adatte al legame di un anticorpo JCV nel
campione a un HPVLP; (c) la rilevazione del livello di anticorpo JCV nel campione preincubato
20 che si lega agli HPVLP immobilizzati; e (d) confrontando il livello rilevato di anticorpi JCV nel
campione biologico preincubato con il livello di anticorpi JCV rilevato in un campione
biologico ottenuto dal soggetto che è stato preincubato in una soluzione senza HPVLP, ed è
stato messo a contatto con HPVLP immobilizzato su un substrato solido in condizioni adatte al
legame di un anticorpo JCV nel campione a un HPVLP, in cui gli HPVLP sono composti da più
25 di 5, almeno 50, 150 o 360 polipeptidi VP1; in cui una diminuzione del livello rilevato di

anticorpi JCV nel campione biologico preincubato rispetto al campione biologico ottenuto dal
soggetto che è stato preincubato in una soluzione senza HPVLP indica che il campione è
positivo per gli anticorpi JCV e il soggetto è a maggior rischio di sviluppare PML, e una
variazione del livello rilevato di anticorpi JCV al di sotto di una percentuale specificata indica
5 che non è presente alcun anticorpo specifico JCV nel campione.

In una forma di realizzazione, il contatto del campione biologico con HPVLP in
soluzione avviene per un periodo di tempo selezionato tra 30 minuti, un'ora o durante la notte a
4 °C.

In una forma di realizzazione preferita, la percentuale specificata è del 40% e il metodo
10 utilizza un ELISA HPVLP. Preferibilmente, il livello di riferimento viene selezionato in modo
da fornire un tasso di falsi negativi pari o inferiore al 3% per il rilevamento degli anticorpi JCV
nel campione ottenuto dal soggetto. Preferibilmente, il livello di riferimento viene selezionato in
modo da fornire un tasso di falsi negativi pari o inferiore all'1% per il rilevamento degli
anticorpi JCV nel campione ottenuto dal soggetto.

15 In una forma di realizzazione, in cui il campione biologico ottenuto dal soggetto è
classificato come negativo per l'anticorpo anti-JCV quando il livello di anticorpo anti-JCV nel
campione biologico pre-incubato che si lega alle HPVLP immobilizzate è approssimativamente
uguale al livello di anticorpo anti-JCV rilevato nel campione biologico ottenuto dal soggetto che
è stato pre-incubato in una soluzione senza HPVLP.

20 In una forma di realizzazione preferita, gli HPVLP contengono più di 1, almeno 5, 10,
20, 30, 40, 50, 60, 70 o 72 pentameri VP1. In alcune forme di realizzazione, un HPVLP
comprende inoltre almeno uno tra un JCV VP2 o un JCV VP3; oppure il VP1 in un HPVLP è un
VP1 ricombinante; oppure almeno un VP1 nell'HPVLP è un VP1 mutante.

25 Preferibilmente il campione biologico è il siero. In alcune forme di realizzazione, il
campione biologico proviene da un soggetto a cui è stato prescritto un immunomodulatore o da

un soggetto che sta valutando di assumere un immunomodulatore, in cui l'immunomodulatore è selezionato tra una terapia anti-VLA-4 e una terapia anti-CD20, una terapia anti-CD11a o micofenolato mofetile. L'immunomodulatore è preferibilmente natalizumab. In alcune forme di realizzazioni, il soggetto a cui è stato prescritto un immunomodulatore, o che sta considerando
5 di assumerne uno, non ha precedentemente assunto l'immunomodulatore. In altre forme di realizzazione, il soggetto ha precedentemente ricevuto una o più dosi dell'immunomodulatore.

In alcune forme di realizzazione, il rilevamento del legame dell'anticorpo JCV agli HPVLP indica che il soggetto: (i) non è un candidato a ricevere il trattamento con un immunomodulatore se il campione biologico è positivo per un anticorpo JCV; o (ii) è un
10 candidato a ricevere il trattamento con un immunomodulatore e un monitoraggio migliorato per i sintomi avversi durante il trattamento con l'immunomodulatore, facoltativamente in cui i sintomi avversi indicano lo sviluppo di PML.

In alcune forme realizzazioni, la mancata rilevazione del legame dell'anticorpo JCV agli HPVLP indica che il soggetto è un candidato a ricevere un trattamento con un
15 immunomodulatore. L'immunomodulatore è preferibilmente il natalizumab.

In alcune forme di realizzazione, un soggetto il cui campione biologico è risultato privo di anticorpi JCV in un test iniziale viene nuovamente sottoposto a test almeno una volta all'anno per la presenza di anticorpi JCV dopo il test iniziale. In alcune forme di realizzazione, il soggetto che al primo appuntamento è risultato positivo alla presenza di anticorpi JCV viene
20 sottoposto a un nuovo test in un secondo momento per determinare se non presenta anticorpi JCV.

In forme di realizzazione altamente preferite, il soggetto è affetto da sclerosi multipla (SM) o morbo di Crohn (CD).

In alcune forme di realizzazione, il riferimento è selezionato per indicare un tasso di
25 falsi negativi non superiore al 3% e una minima reattività crociata ad altri componenti del

campione come anticorpi contro altri virus del polioma, *ad esempio*, il virus BK (BKV). Il riferimento è ricavato da un campione di controllo o da un set di campioni elaborati con il campione del soggetto. In alcune forme di realizzazione, il riferimento viene selezionato in modo tale che il tasso di falsi negativi del saggio non sia superiore all'1%.

5 In un caso, almeno il 10% circa delle HPVLP in una preparazione di HPVLP purificate contiene più di cinque polipeptidi VP1 per HPVLP. In altri esempi, almeno circa il 15%, circa il 20%, circa il 25%, circa il 30%, circa il 40%, circa il 50%, circa il 60%, circa il 65%, circa il 70%, circa l'80% o circa il 90% delle HPVLP in una preparazione di HPVLP purificate contiene più di cinque polipeptidi VP1 per HPVLP.

10 L'HPVLP è immobilizzato su un substrato solido come una piastra di microtitolazione o un vetrino. L'HPVLP è costituito essenzialmente dalla proteina virale VP1. L'HPVLP può inoltre includere altre proteine virali, ad esempio almeno una tra una VP2 o VP3 di JCV. La proteina virale nell'HPVLP può essere derivata in modo ricombinante (*ad esempio*, un ceppo VP1 MAD1) o può essere una proteina virale presente in natura (*ad esempio*, derivata da una
15 fonte presente in natura, Il metodo può essere eseguito utilizzando, ad esempio, un campione biologico ottenuto da un soggetto attualmente in trattamento con un farmaco immunomodulatore, un soggetto che stia considera di iniziare un trattamento con un farmaco immunomodulatore o un soggetto con sospetta leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML). Il metodo rivendicato

20 è un saggio in due fasi che include un processo di saggio di conferma secondario che include il contatto di una porzione del campione biologico del soggetto con HPVLP in soluzione (prima di incubare il campione con l'HPVLP attaccato a un substrato solido), fornendo così un campione secondario; il contatto del campione secondario con HPVLP nelle stesse condizioni utilizzate per il saggio primario; il rilevamento del livello di legame dell'anticorpo JCV
25 all'HPVLP nel campione secondario; e il confronto del livello rilevato di anticorpo JCV nel

campione secondario con il livello di anticorpo JCV nel campione che non è stato preincubato con HPVLP solubile, in modo tale che una diminuzione del livello rilevato nel campione del saggio secondario rispetto al campione che non è stato preincubato indica che il campione è positivo per l'anticorpo JCV e una variazione del livello rilevato al di sotto di una percentuale specificata indica che non è presente alcun anticorpo specifico JCV nel campione.

Un saggio descritto in questo contesto può essere utilizzato per saggiare la presenza di anticorpi anti-JCV in un soggetto che non abbia mai ricevuto un trattamento con un immunomodulatore; o in un soggetto che abbia precedentemente ricevuto un immunomodulatore, ma che non stia più ricevendo un trattamento con l'immunomodulatore; o in un soggetto che sia attualmente sottoposto a trattamento con un immunomodulatore.

Il rilevamento di anticorpi anti-JCV che si legano alle HPVLP in un saggio descritto nell'invenzione può indicare che un soggetto presenta un rischio maggiore di PML. Il rilevamento di anticorpi anti-JCV può anche indicare che il soggetto è a rischio aumentato di sintomi avversi, come lo sviluppo di PML, a seguito di somministrazione di alcuni agenti terapeutici, come alcuni immunomodulatori, e pertanto il soggetto non è un candidato per il trattamento con questi agenti. Ad esempio, il rilevamento di anticorpi anti-JCV in un campione da un soggetto può indicare che il soggetto non è un candidato per il trattamento con un agente terapeutico anti-VLA-4, come il natalizumab. Il rilevamento di anticorpi anti-JCV in un campione biologico può indicare che il soggetto è un candidato per il trattamento con un immunomodulatore, come il natalizumab, con l'eccezione che il soggetto sarà sottoposto a un monitoraggio avanzato durante il trattamento rispetto a un soggetto che non ha anticorpi anti-JVC rilevabili. Ad esempio, il monitoraggio avanzato può includere l'osservazione di sintomi avversi, come sintomi che possono indicare lo sviluppo di PML.

Il mancato rilevamento degli anticorpi anti-JCV che si legano alle HPVLP in un saggio descritto nell'invenzione può indicare che il soggetto è candidato a ricevere un trattamento con

un immunomodulatore, come il natalizumab, e in un caso, al soggetto viene ulteriormente somministrato l'immunomodulatore. Un soggetto che si determini non abbia anticorpi anti-JCV può essere riesaminato almeno annualmente (ad esempio, almeno ogni 3 mesi, ogni 6 mesi, ogni 9 mesi o ogni 12 mesi) per determinare se il soggetto abbia sviluppato anticorpi anti-JCV, che
5 potrebbe indicare che il soggetto è stato infettato da JCV. Un soggetto che in precedenza non aveva anticorpi anti-JCV rilevabili in un campione biologico e che successivamente sviluppa anticorpi anti-JCV in un campione biologico può interrompere il trattamento con un immunomodulatore.

In alcune forme di realizzazione, un soggetto che era stato precedentemente identificato
10 come presentante anticorpi anti-JCV può essere successivamente testato in un secondo momento e determinato come non presentante anticorpi anti-JCV. Questi soggetti possono essere determinati per essere candidati a ricevere un trattamento con un immunomodulatore, come il natalizumab. In un caso, a un soggetto che in precedenza è risultato positivo alla presenza di anticorpi anti-JCV e che successivamente è risultato negativo agli anticorpi anti-
15 JCV può essere somministrato l'immunomodulatore ed essere sottoposto a monitoraggio avanzato rispetto a un soggetto che non è mai risultato positivo agli anticorpi anti-JCV, come ad esempio per monitorare sintomi che potrebbero indicare lo sviluppo di PML.

Un saggio descritto nell'invenzione è utile per trattare un soggetto affetto da una malattia o un disturbo immunologico, come la sclerosi multipla (SM) o il morbo di Crohn. Il
20 saggio rivendicato è stato convalidato per l'uso in pazienti con SM e CD ed è efficace per rilevare gli anticorpi JCV in pazienti con SM e CD in un ambiente di test controllato, come in una sperimentazione clinica.

In un aspetto, la descrizione presenta un metodo per identificare un soggetto a rischio di sviluppare PML, ad esempio ottenendo un campione biologico dal soggetto; mettere il
25 campione biologico a contatto con HPVLP in condizioni adatte per il legame di un anticorpo del

virus JC (JCV) nel campione a una HPVLP; rilevare il livello di legame dell'anticorpo anti-JCV nel campione con HPVLP; e correlare il livello rilevato con un set di riferimento, in cui il soggetto è a maggior rischio di PML se viene rilevato il legame con anticorpi anti-JCV. Il set di riferimento viene selezionato per indicare un tasso di falsi negativi di circa il 5%, circa il 3%,
5 circa l'1% o meno.

In un altro aspetto, la descrizione presenta un metodo per identificare il rischio di PML in un soggetto determinando il livello di anticorpi anti-JCV in un campione dal soggetto, ad esempio da un campione di plasma, sangue o siero; e assegnando un livello di rischio al soggetto in base al livello di anticorpi anti-JCV nel campione. Il soggetto può ricevere una
10 terapia immunomodulatoria, come un trattamento anti-VLA4, *ad esempio* natalizumab, o può essere un candidato per ricevere una terapia immunomodulatoria. In alcuni casi, al soggetto è stata diagnosticata una malattia o un disturbo immunologico, come la sclerosi multipla o il morbo di Crohn. Nell'invenzione, il livello di anticorpi anti-JCV viene determinato utilizzando un saggio in due fasi. Il saggio in due fasi può includere un saggio ELISA.

15 Il metodo rivendicato include determinare il livello di anticorpi anti-JCV nel soggetto in un campione da una data successiva al campione iniziale; confrontare il livello di anticorpi anti-JCV nel campione dalla data successiva con il livello nel campione dal campione iniziale; e determinare se il soggetto sia a maggior rischio di PML nella data successiva rispetto al momento del campione iniziale.

20 In un aspetto, la descrizione presenta un metodo per monitorare il rischio di PML in un soggetto, il metodo comprendendo determinare il livello di anticorpi anti-JCV in un soggetto utilizzando un campione da una prima data; assegnare un rischio di PML (*ad esempio* alto o moderato o a basso rischio) in base al livello di anticorpi anti-JCV nel soggetto alla prima data; determinare il livello di anticorpi anti-JCV nel soggetto utilizzando un campione da una seconda
25 data; e assegnare un rischio di PML (*ad esempio* alto o moderato o a basso rischio) in base al

livello di anticorpi anti-JCV nel soggetto alla seconda data.

Come utilizzato in questo contesto, una "HPVLP" è una VLP ("particella virus-simile") altamente purificata costituita prevalentemente dalla proteina VP1. Una "HPVLP" descritta nell'invenzione è composta principalmente dalla proteina capsidica maggiore "VP1",
5 che può essere una VP1 presente in natura o una VP1 ricombinante, dal polyomavirus, virus JC (JCV). Una HPVLP può essere composta, ad esempio, da più di una subunità pentamerica, almeno 10 subunità pentameriche, almeno 20 subunità pentameriche, almeno 30 subunità pentameriche, almeno 50 subunità pentameriche, almeno settantadue subunità pentameriche o più di VP1. Una HPVLP può contenere polipeptidi VP1 in una configurazione
10 indeterminata (*ad esempio*, i polipeptidi possono o meno essere organizzati in pentameri), nel qual caso una HPVLP può essere composta da più di 5 polipeptidi VP1, almeno 50 VP1 polipeptidi, almeno 150 VP1 polipeptidi, almeno 360 VP1 polipeptidi o più. Le HPVLP includono i capsomeri, che contengono da 10 a 24 pentameri. Una HPVLP descritta nell'invenzione può legare gli anticorpi contro il virus JC intatto, presente in natura. In alcune
15 forme di realizzazione, una HPVLP include un secondo e opzionalmente un terzo tipo di polipeptide che è una proteina capsidica 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*
20 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, una preparazione altamente purificata di VLP è ottenuta purificando le particelle almeno due volte mediante centrifugazione, *ad esempio* attraverso un cuscino di saccarosio. In generale, una preparazione HPVLP può essere
25 identificata dalla sua attività in un saggio 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 anti-JCV.

Salvo diversa definizione, tutti i termini tecnici e scientifici utilizzati nel presente contesto hanno lo stesso significato comunemente compreso dall'esperto della tecnica alla quale appartiene la presente invenzione. I materiali, i metodi e gli esempi sono soltanto illustrativi e non intendono essere limitativi.

I dettagli di una o più forme di realizzazione dell'invenzione sono esposti nei disegni allegati e nella descrizione che segue. La presente invenzione e le sue forme di realizzazione sono esposte nelle rivendicazioni allegate.

10 DESCRIZIONE DEI DISEGNI

La FIG. 1 è un grafico che illustra i risultati di un saggio ELISA HPVLP su campioni da soggetti positivi al DNA di JCV nelle urine (uro-positivi) e negativi al DNA di JCV nelle urine (uro-negativi). Il riquadro rappresenta l'intervallo interquartile (IQR) con la linea mediana al centro; le parentesi rappresentano le osservazioni entro 1,5 volte l'IQR. I segni "+" rappresentano le osservazioni oltre 1,5 volte l'IQR (valori anomali). *Test U di Mann-Whitney.

La FIG. 2 è un grafico che illustra i livelli di anticorpi anti-JCV misurati mediante ELISA contro il livello di DNA di JCV urinario misurato mediante qPCR (n = 204). I cerchi aperti rappresentano campioni di urina e siero raccolti in punti temporali STRATA abbinati. I cerchi chiusi rappresentano campioni raccolti in punti temporali diversi. Per 17 campioni con risultati del test del DNA inferiori al livello di quantificazione (<500 copie/mL), il livello è stato impostato sul limite di rilevamento.

La FIG. 3 è un grafico che illustra i dati di reattività incrociata di BKV-JCV da un coniglio immunizzato con BKV. Antisieri di BKV VLP da coniglio con immunizzazione BKV con alta affinità ($EC_{50} = 1:100.000$) e sottoposti a reattività incrociata con JCV VLP ($EC_{50} = 1:5.000$).

Le FIGG. 4A e 4B illustrano la reattività del saggio anti-JCV nei campioni di siero di pazienti uronegativi (n=311) (FIG. 4A) e uropositivi (n=204) (FIG. 4B) negli ELISA di screening e di conferma. Viene mostrata la distribuzione della reattività sierologica dei campioni nello screening ELISA, con punti di taglio inferiori ($nOD_{450} = 0,10$) e superiori ($nOD_{450} = 0,25$)
5 evidenziati (pannelli di sinistra). Nell'ELISA di conferma supplementare (pannelli di destra), è evidenziato (linea verticale) un punto di inibizione del 40% con regioni ombreggiate che indicano campioni che non hanno confermato la presenza anticorpi specifici anti-JCV ($nOD_{450} \leq 0,25$ e percentuale di inibizione $\leq 40\%$).

Le FIGG. 5A e 5B sono istogrammi che illustrano la frequenza delle osservazioni entro
10 ciascun intervallo di inibizione del 10% per tutti i pazienti (n=515) (FIG. 5A) e per i pazienti uropositivi (n=204) (FIG. 5B). La distribuzione consisteva in due picchi chiaramente definiti, separati in modo ottimale al 40% di inibizione. Un livello di inibizione del 40% corrispondeva a circa il quinto percentile più basso della distribuzione di risposta dei campioni uro-positivi.

Le FIGG. 6A e 6B sono grafici dei valori nOD_{450} dall'ELISA di screening (FIG. 6A)
15 rispetto ai valori percentuali di inibizione dall'ELISA di conferma (FIG. 5B) per gli 11 campioni pre-PML. Le linee orizzontali rappresentano valori nOD_{450} di 0,10 e 0,25, la linea verticale rappresenta un'inibizione percentuale del 40%.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Un saggio sensibile per gli anticorpi anti-JCV che riduce al minimo i falsi negativi e
20 riduce al minimo il rilevamento di anticorpi a reazione incrociata è utile per l'identificazione di individui che sono stati esposti a JCV. L'impiego di tale test può essere utile nell'identificazione di individui che hanno un'infezione JCV corrente o che hanno avuto una esposizione passata a JCV sufficiente a sviluppare anticorpi contro il virus. Tale saggio può anche fornire uno strumento per assistere i medici con la vigilanza clinica e la stratificazione del rischio di PML.
25 Ad esempio, tale test può essere utile per professionisti e pazienti come parte di una valutazione

del rischio di PML in fase di sviluppo, valutando accuratamente se un soggetto sia stato esposto a JCV. In alcuni casi, l'analisi può includere la determinazione dei livelli di anticorpi anti-JCV in un campione biologico del paziente.

Alcune difficoltà si riscontrano nello sviluppo di un saggio utile per gli anticorpi anti-JCV, ad esempio la creazione di punti di taglio convalidati. Le richiedenti hanno risolto questo problema utilizzando dati derivati da saggi di campioni di urina e plasma da pazienti che sono uropositivi o uronegativi per il DNA di JCV. Un altro problema è lo sviluppo di un saggio con specificità e riproducibilità. Le richiedenti hanno risolto questo problema utilizzando una particella contenente proteina virale altamente purificata in un saggio anticorpale. Inoltre, le richiedenti hanno scoperto che l'uso di un saggio secondario per risolvere campioni con risultati ambigui nel saggio primario migliora l'utilità del saggio per fornire un risultato utile per tali campioni.

Di conseguenza, è stato sviluppato un saggio validato analiticamente che utilizza una particella virus-simile altamente purificata contenente VP1 (VLP) per rilevare la presenza di anticorpo anti-JCV in un fluido corporeo come siero, plasma, urina, liquido cerebrospinale o altro fluido corporeo che contiene anticorpi. Negli esperimenti per convalidare il nuovo saggio, è stata identificata una prevalenza di circa il 54% di anticorpi anti-JCV in una popolazione di pazienti con SM arruolati in uno studio clinico. Una caratteristica chiave del saggio descritto in questo contesto è l'uso di una particella virus-simile altamente purificata (HPVLP).

Un vantaggio del saggio descritto in questo contesto è che ha un tasso di falsi negativi relativamente basso, *ad esempio* un tasso di falsi negativi di circa il 10%, circa l'8%, circa il 6%, circa il 4%, circa il 3%, circa l'1% o inferiore per il rilevamento di anticorpi anti-JCV. In generale, il saggio ha un tasso di falsi negativi di solo circa il 3% o inferiore per il rilevamento di anticorpi anti-JCV. Come descritto in questo contesto, il nuovo saggio può essere utilizzato per monitorare il tasso di sieroconversione per JCV. Ad esempio, il saggio è stato utilizzato per

scoprire un tasso di sieroconversione annuale non superiore al 2% circa in una coorte testata di soggetti inizialmente negativi per l'anticorpo anti-JCV. Ciò dimostra che il saggio può essere utile per monitorare lo stato di esposizione di un individuo a JCV nel tempo.

Il saggio può essere utilizzato per il rilevamento di anticorpi anti-JCV in qualsiasi
5 soggetto umano, incluso un soggetto che stia considerando un 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 soggetto attualmente trattato con un immunomodulatore; o un
10 soggetto che abbia cessato il trattamento con un immunomodulatore. Il saggio può essere utile ad altri che possono essere suscettibili alla PML come individui con disturbi linfoproliferativi, come il mieloma multiplo o un linfoma; individui infetti da virus dell'immunodeficienza umana (HIV) o con sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS), neoplasie ematologiche o una malattia autoimmune come il lupus eritematoso sistemico (LES), una malattia infiammatoria intestinale, come il morbo di Crohn (CD) o ulcerosa colite, sclerosi multipla (SM) o artrite, *ad*
15 *es.*, artrite reumatoide (AR). Il saggio può anche essere utile per soggetti che ricevono terapie immunosoppressive o immunomodulatorie, come pazienti sottoposti a trapianto. Terapie immunosoppressive o immunomodulatorie esemplificative includono natalizumab, rituximab, efalizumab e micofenolato mofetile. Il saggio può essere utile per il rilevamento degli anticorpi anti-JCV in un soggetto affetto da un disturbo o in trattamento con un farmaco, descritto in
20 Piccinni et al. "Stronger association of drug-induced progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) with biological immunomodulating agents" Eur. J. Clin. Pharmacol. 66:199-206, 2010.

VPI

È stato scoperto che l'uso di HPVLP in un saggio per anticorpi anti-JCV può migliorare l'accuratezza del saggio ed è utile in un saggio adatto a scopi analitici e diagnostici. VPI per
25 l'uso nella produzione di HPVLP può essere generata utilizzando metodi noti nella tecnica e può

essere VP1 presente in natura o VP1 prodotta in modo ricombinante, *ad esempio* VP1 da un virus JCV. In generale, la VP1 utilizzata è VP1 dal ceppo MAD1 di JCV. Il VP1 utilizzato nel saggio può comprendere 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 sintetizzato in modo ricombinante, il VP1 per l'uso nei saggi descritti nel presente documento viene quindi ulteriormente purificato tramite metodi biochimici standard, inclusi 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 una fase per rimuovere proteine più piccole, compresi i polipeptidi di monomeri VP1 o pentameri VP1. La rimozione di queste particelle più piccole può essere eseguita, ad esempio, in una fase o in due fasi (ad esempio una prima fase di filtrazione per rimuovere monomeri VP1, e quindi una seconda fase di filtrazione per rimuovere le particelle di pentameri VP1, Tali metodi di purificazione biochimica sono noti agli esperti della tecnica. Gli esempi 1 e 7 forniscono due metodi diversi di purificazione di JCV VP1-VLP. La HPVLP può essere preparata da VP1 ricombinante o VP1 presente in natura (*ad esempio* isolata da virus o virus capsidico). In alcune forme di realizzazione, componenti di JCV addizionali, come una o entrambe le proteine di rivestimento minori del virus JC, *ad esempio* VP2 o VP3, sono inclusi nella particella HPVLP o sono associati al substrato.

In alcuni casi, VP1 espressa in modo ricombinante può non assemblarsi in pentameri o HPVLP che somigliano a capsidi virali presenti in natura, ad esempio, VP1 espressa in modo ricombinante può assemblarsi in tubi o altre geometrie non sferiche.

Metodi per produrre HPVLP

Le 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 utilizzato per infettare una coltura cellulare, come una coltura di cellule di insetto (*ad esempio* cellule

SF9) o una coltura di cellule 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 quali la sedimentazione a cuscino di saccarosio, l'ultracentrifugazione isopicnica e l'ultrafiltrazione estensiva o altri metodi noti agli esperti della tecnica. La purificazione può includere la centrifugazione doppia delle 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.

10 La purezza può essere valutata utilizzando qualsiasi tecnica adatta nota nella tecnica, ad esempio ultracentrifugazione analitica, microscopia elettronica, analisi PAGE, spettrometria di massa, concentrazione di proteine o attività in un saggio ELISA con sieri di controllo. Le VLP purificate in modo insufficiente producono uno sfondo elevato che produce livelli di anticorpi anti-JCV falsamente elevati o tassi di esposizione calcolati.

15 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 di rivestimento minori del virus JC, *ad esempio* VP2 o VP3. In un'altra forma di realizzazione, l'HPVLP include proteine VP1, VP2 e VP3. Una HPVLP che include VP1 e VP2 può essere prodotta utilizzando metodi noti nella tecnica, ad esempio trasformando un baculovirus con un acido nucleico comprendente un gene VP1 e 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 la forma di HPVLP che include entrambi i tipi di proteine. 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 la forma di HPVLP che include entrambi i tipi di proteina. In alcuni casi, una HPVLP eterogenea include, ad esempio, uno o due polipeptidi VP2 ogni cinque polipeptidi VP1. In generale, una HPVLP contiene più polipeptidi VP1 rispetto ai polipeptidi VP2, come nel caso del virus JC
5 presente in natura.

Una HPVLP che include sia VP1 sia VP3 o entrambe le molecole VP1 e VP2 può essere prodotta, ad esempio, trasformando un baculovirus con un acido nucleico comprendente un gene VP1 e VP3 o un gene VP1 e VP2, rispettivamente, sotto il controllo degli stessi o di diversi promotori. Una coltura cellulare è infettata dal baculovirus e le cellule esprimono VP1 e VP3 o
10 VP1 e VP2 e la forma di HPVLP che include entrambi i tipi di proteine. I geni VP1 e VP3 o VP1 e VP2 possono trovarsi su diverse molecole di DNA, le molecole di DNA vengono trasformate e i baculovirus vengono utilizzati per trasfettare le cellule nella stessa coltura. Le cellule esprimono le proteine VP1 e VP3 o i geni VP1 e VP2, rispettivamente, e la forma di HPVLP che include entrambi i tipi di proteina. Le particelle di HPVLP possono essere isolate da
15 tali preparazioni utilizzando metodi noti nella tecnica, come quelli utilizzati per isolare i capsidi JCV.

Tipicamente, un pentamero VP1 che è 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 un gene VP2 per realizzare i costrutti. In una HPVLP ci saranno
20 tipicamente più polipeptidi VP1 che polipeptidi VP3 o VP2. In alcuni casi, VP2 o VP3 provengono da un poliomavirus che non è un virus JC, *ad esempio* un polipeptide di virus 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
25 promotori. Una coltura cellulare, come una coltura cellulare di mammifero, è infettata dal

baculovirus e le cellule esprimono le proteine VP1, VP2 e VP3. Di conseguenza, si formano HPVLP che includono tutti e tre i tipi di proteine. La VP1 e uno o entrambi i geni VP2 e VP3 possono trovarsi su diverse molecole di DNA, le molecole di DNA vengono trasformate nello stesso o diverso baculovirus e i baculovirus vengono utilizzati per infettare le cellule nelle stesse
5 colture o in colture separate. Le cellule esprimono le proteine VP1, VP2 e VP3 e la forma di HPVLP che include entrambi i tipi di proteina. Una HPVLP eterogeneo 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 saranno tipicamente più polipeptidi VP1 che polipeptidi VP2 e VP3.

10 L'HPVLP può avere dimensioni maggiori del pentamero 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 generale, una preparazione a base di HPVLP adatta per l'uso in un saggio contiene almeno il 20% di HPVLP, almeno il 25% di HPVLP, almeno il 40% di HPVLP, almeno il 60%
15 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 di pentameri rispetto ai monomeri e aggregati VP1 contenenti meno di cinque molecole VP1).

Punto di taglio

20 L'invenzione fornisce metodi di analisi che impiegano "punti di taglio" per ridurre i tassi di falsi negativi e falsi positivi. I punti di taglio sono stabiliti sulla base dei dati dei saggi HPVLP (*ad esempio*, per rilevare anticorpi anti-JCV in un campione biologico) mediati, ad esempio, tra campioni sperimentali duplicati e replicati multipli (ad esempio almeno due, almeno quattro o almeno otto replicati di campioni di controllo).

25 In una versione di un saggio secondo la presente descrizione, i risultati dei saggi di

screening HPVLP iniziali, *ad esempio* saggi ELISA, determinano la classificazione di un campione come avente o meno anticorpi anti-JCV specifici o, se il campione non rientra in una di queste due classificazioni, il campione viene quindi sottoposto a un saggio di conferma supplementare. Ad esempio, i campioni che producono un risultato in un saggio ELISA di HPVLP descritto nell'invenzione inferiore a un livello stabilito (*ad esempio*, un $nOD_{450} < 0,1$) vengono classificati come privi di anticorpi anti-JCV specifici e campioni che forniscono un risultato nel saggio ELISA superiore a un livello stabilito (*ad esempio*, un $nOD_{450} > 0,25$) vengono classificati come positivi agli anticorpi anti-JCV specifici. I campioni che non rientrano chiaramente in una di queste classificazioni (*ad esempio*, $0,1 < OD_{450} < 0,25$) possono essere testati in un saggio di conferma. Nel metodo rivendicato, il saggio di conferma richiede una fase di preincubazione, in cui il campione sperimentale viene preincubato con controllo tampone (o altra soluzione adatta) o con HPVLP (in tampone o altra soluzione adatta) per pre-adsorbire anticorpi anti-JCV specifici prima dell'analisi in un saggio ELISA di HPVLP, come descritto in ulteriore dettaglio di seguito. In una forma di realizzazione, se dopo la preincubazione con HPVLP, se la reazione nel saggio primario diminuisce di meno del 40% rispetto al controllo tampone, il campione viene interpretato come negativo per la presenza di anticorpi anti-JCV specifici. Se i risultati mostrano una riduzione $\geq 40\%$ della reazione rispetto al controllo tampone nel saggio primario dopo la preincubazione con HPVLP, il campione viene interpretato come contenente anticorpi anti-JCV specifici.

Un esempio di un metodo per selezionare e verificare punti di taglio adatti è fornito nell'Esempio 4.

Substrato

Qualsiasi substrato solido adatto può essere utilizzato per il formato del saggio HPVLP. Il substrato può essere una piastra per microtitolazione (*ad esempio* una piastra a 96 pozzetti), uno slide, una perla o una colonna. Il substrato può essere adatto per metodi di rilevamento

cromogenico o chemiluminescente.

Saggio

Le analisi vengono condotte aggiungendo un campione biologico a un substrato rivestito con un HPVLP e rilevato utilizzando metodi noti nella tecnica. In generale, viene
5 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 nella tecnica. Il campione biologico può essere diluito prima di essere utilizzato in un saggio.

Il formato del saggio può essere un immunoenzimatico (ELISA). In generale, il metodo include tipicamente il rivestimento del substrato con antigene di cattura come HPVLP,
10 l'incubazione del campione contenente anticorpi leganti diretti a catturare il reagente, il lavaggio per rimuovere specie non specificatamente legate e il rilevamento dei complessi immuni legati, *ad esempio* mediante un saggio cromogenico o chemiluminescente. I substrati cromogenici producono un prodotto finale colorato che può essere rilevato e misurato visivamente o con l'uso di uno spettrofotometro. I substrati chemiluminescenti producono luce,
15 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 a base di HPVLP a una concentrazione adeguata (*ad esempio*, 1 µg/mL) per una notte o per un numero specificato di ore. La HPVLP può includere VP1 come unico componente virale JCV oppure la
20 HPVLP può essere una particella eterologa che contiene almeno una tra VP2 o VP3 per particella o almeno una ciascuna 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 o
25 soluzioni di latte in polvere.

Il campione o riferimento viene incubato sul substrato preparato in condizioni efficaci per consentire la formazione di complessi (HPVLP/anticorpo anti-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
5 umane o IgG e IgM umane. In alcuni casi, il saggio 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 che sia noto essere infettato dal virus JC in base alla presenza di DNA di JCV nelle urine dell'individuo (uro-
10 positivo). Un campione di riferimento viene utilizzato per stabilire il punto di taglio del saggio in modo tale che il tasso di falsi negativi del saggio non sia maggiore dell'1% -3%.

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

Le condizioni "adatte" includono anche condizioni che sono a una temperatura e / o per un periodo di tempo sufficiente a consentire un legame efficace. Le incubazioni sono tipicamente da circa una a due ore o da una a quattro ore, a temperature da circa 25 ° C a 27 ° C,
20 o possono essere durante la notte a circa 4 ° C. Tuttavia, coloro che sono nella tecnica capiranno che altre condizioni possono essere adatte.

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

25 In generale, il rilevamento dell'anticorpo legato all'HPVLP viene eseguito utilizzando

metodi ben noti nella tecnica. In generale, tali metodi si basano sul rilevamento di un'etichetta o di un marcatore, come un tag radioattivo, fluorescente, biologico o enzimatico. I brevetti U.S. riguardanti l'uso di tali etichette includono, ad esempio, Brevetti U.S. 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, la
5 rilevazione del legame degli anticorpi anti-JCV viene eseguita utilizzando un anticorpo secondario marcato. In generale, 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 spettro visibile.

L'esempio 2 illustra un metodo per eseguire il saggio e gli esperti della tecnica
10 comprenderanno che possono essere apportate opportune modifiche.

Il saggio può essere eseguito in uno studio medico, ad esempio da un operatore sanitario, *ad esempio* un medico, un infermiere o un tecnico una struttura in cui il campione biologico viene ottenuto da un paziente. Il campione biologico ottenuto da un paziente può essere trasportato in un'altra struttura, *ad esempio* in una struttura di terze parti, dove viene
15 eseguito il saggio. In quest'ultimo caso, i risultati del saggio possono essere riportati al professionista sanitario, ad esempio tramite un modulo, che può essere inviato per posta o per via elettronica (*ades.* tramite fax o e-mail) o tramite un database on-line. I risultati del saggio (incluso il saggio di screening e, opzionalmente, un saggio di conferma) possono essere memorizzati in un database e possono essere consultati da un operatore sanitario, come
20 attraverso il web mondiale.

Test secondario

Nella presente invenzione, viene impiegato un saggio secondario (indicato anche come "saggio di conferma" in questo contesto) del campione. Per il test secondario vengono utilizzate due aliquote di un campione biologico. La prima viene preparata prima dell'uso nel saggio
25 preincubando il campione in presenza di tampone di saggio in soluzione per un periodo di

tempo (*ad esempio*, 30 minuti, un'ora o più, *ad esempio* per una 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*, 30 minuti, o un'ora o più). Le due aliquote vengono quindi utilizzate nel saggio HPVLP come descritto in questo contesto e viene
5 effettuata l'assegnazione del campione come positivo all'anticorpo anti-JCV o negativo all'anticorpo. Se i risultati del saggio per l'aliquota incubata con HPVLP in soluzione sono uguali a quelli della prima aliquota incubata con tampone nel saggio primario (*vale a dire*, circa la stessa OD), il campione è interpretato come negativo alla presenza di anticorpi anti-JCV specifici. Se i risultati del saggio sono inferiori dopo preincubazione (*vale a dire*, nel saggio
10 secondario), il campione è interpretato come contenenti anticorpi anti-JCV specifici.

Il saggio dell'invenzione è anche denominato nel presente documento "saggio in due fasi" o "saggio in due fasi".

Presentazione dei risultati del saggio

Il saggio include una lettura che può essere un livello (*ad esempio*, OD) relativo a un
15 riferimento o una lettura che è una valutazione del fatto che il campione sia positivo, negativo o indeterminato per la presenza di anticorpi anti-JCV.

L'HPVLP può essere fornita in qualsiasi forma, *ad esempio* liquida, essiccata, semi-essiccata o liofilizzata o in una forma per la conservazione in condizioni congelate. Gli HPVLP preparati possono essere trasformati in pellet e conservati in forma semisolida.

20 In genere, le HPVLP vengono fornite in un formato sterile. Quando l'HPVLP viene fornita in una soluzione liquida, la soluzione liquida generalmente è una soluzione acquosa, *ad esempio* una soluzione acquosa sterile. Quando l'HPVLP viene fornita in forma essiccata, la ricostituzione viene generalmente ottenuta aggiungendo un solvente adatto. Il solvente, *ad esempio* tampone sterile, può facoltativamente essere fornito nel kit.

25 In alcuni casi, un campione biologico viene fornito a un fornitore di saggi, *ad esempio*

un fornitore di servizi (come una struttura di terze parti) o un operatore sanitario, che valuta il campione in un saggio e fornisce una lettura. Ad esempio, in un caso, un fornitore di analisi riceve un campione biologico da un soggetto, come un campione di plasma, sangue o siero, e valuta il campione usando un saggio descritto in questo contesto e determina che il campione
5 contiene anticorpi anti-JCV. Il fornitore del saggio, *ad esempio* un fornitore di servizi o un fornitore di servizi sanitari, può quindi concludere che il soggetto è a maggior rischio di PML. Il fornitore del saggio può inoltre determinare che il soggetto non è un candidato a ricevere un trattamento con un immunomodulatore, come una terapia anti-VLA, come il natalizumab, o che il soggetto è candidato a ricevere un trattamento con un immunomodulatore ma il candidato
10 avrà un monitoraggio avanzato rispetto a un soggetto che venga determinato non avere anticorpi anti-JCV. Ad esempio, il candidato verrà esaminato più frequentemente per lo sviluppo di sintomi avversi, come sintomi che potrebbero indicare lo sviluppo di PML.

Il fornitore del saggio può eseguire un saggio descritto nel presente documento e determinare che un soggetto non presenta anticorpi JCV rilevabili. Il fornitore del saggio
15 determina inoltre che il soggetto è candidato a ricevere un trattamento con un immunomodulatore, come il natalizumab. Il fornitore del saggio informa un operatore sanitario che il soggetto è un candidato per il trattamento con l'immunomodulatore e al candidato viene somministrato l'immunomodulatore.

Il fornitore del dosaggio può fornire i risultati della valutazione e, opzionalmente, le
20 conclusioni riguardanti una o più diagnosi, prognosi o opzioni terapeutiche appropriate, ad esempio, a un operatore sanitario, a un paziente o a una compagnia di assicurazioni, in qualsiasi formato adatto, ad esempio per posta o elettronicamente o tramite un database online. Le informazioni raccolte e fornite dal fornitore del saggio possono essere archiviate in un database.

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

ESEMPI

Esempio 1: sintesi e purificazione di particelle VP1 altamente purificate

HPVLP costituite da proteina capsidica VP1 di JCV o BKV sono state prodotte in cellule di insetto SF9 trasfettate con un baculovirus ricombinante. Nel caso delle particelle
5 contenenti JCV VP1, il baculovirus ricombinante è stato trasformato con un acido nucleico esprimene VP1 dal ceppo Mad-1 di JCV. La VLP ricombinante è stata raccolta prima della lisi cellulare ed è stata purificata mediante ultracentrifugazione differenziale, lavaggio con detergente e ultrafiltrazione.

In breve, le cellule infettate con baculovirus sono state raccolte circa tre giorni dopo
10 l'infezione mediante centrifugazione a $3000 \times G$ e conservate congelate fino alla purificazione di HPVLP. La purificazione è stata eseguita utilizzando circa 100 grammi di pellet di cellule congelate. Le cellule scongelate sono state lisate in 500 mL di PBS integrato con 0,1 mM di $CaCl_2$ (PBS-C). Le cellule vengono distrutte facendo passare la sospensione cellulare due volte
15 attraverso un Microfluidizer Microfluidics®. I detriti cellulari sono stati rimossi mediante pellettizzazione a $8000 \times G$ per 15 minuti. Il volume di surnatante è stato regolato a 720 mL con PBS-C e caricato su 5 mL di cuscinetti di saccarosio al 40%. Le HPVLP sono state pellettate due volte attraverso i cuscinetti di saccarosio in un rotore SW28 a $100.000 \times G$ per 5 ore. I pellet di HPVLP sono stati risospesi in PBS/ $CaCl_2$ e poi trattati con desossicolato allo 0,25% per 1 ora a $37^\circ C$, seguita dall'aggiunta di NaCl integrato con 4 M/ $CaCl_2$ 0,1 mM per 1 ora a $4^\circ C$.
20 Il materiale precipitato è stato rimosso mediante centrifugazione a $8000 \times G$ per 15 minuti. Il surnatante risultante è stato concentrato e il tampone scambiato mediante ultrafiltrazione attraverso una membrana Pelicon-2 da 500.000 MWCO (Millipore). Le VLP concentrate sono state applicate al centro di un gradiente di fase del 25-40% di Optiprep™ (Sigma, St. Louis, MO) e legate a $190.000 g$ per 17 ore in un rotore di tipo 50.2. Le bande VLP sono state raccolte e
25 quindi concentrate, il tampone scambiato in una cella agitata Amicon (Millipore) con una

membrana da 300.000 MWCO (limite di esclusione molecolare). Il materiale concentrato è stato filtrato attraverso un filtro in PES (polietersulfone) da 0,22 μ e conservato a 4 °C. Nel presente documento le VLP preparate in questo modo vengono denominate HPVLP. La qualità delle VLP è generalmente determinata mediante elettroforesi su gel e microscopia elettronica.

5 Per denaturare le VLP per la determinazione proteica sono stati addizionati EDTA, DTT e SDS rispettivamente alle concentrazioni finali di 2 mM, 2 mM e il 2%. La concentrazione della proteina completamente denaturata è stata determinata utilizzando il saggio Pierce BCA (acido bicinconinico).

10 Per l'analisi mediante elettroforesi su gel, un volume sufficiente a fornire da 2 μ g a 5 μ g di proteina totale è stato caricato su gel di poliacrilammide prefusi dal 4% al 20% (NOVEX, San Diego, CA) utilizzando un sistema tampone di acido morfolinetansolfonico-SDS NuPAGE® (Invitrogen, Carlsbad, CA). I gel sono stati sottoposti a elettroforesi a una corrente costante da 70 mA/gel a 80 mA/gel per 30 minuti. Le bande proteiche sono state fissate con il 50% di metanolo e il 10% di acido acetico in acqua distillata e visualizzate con un reagente colloidale
15 commerciale blu di Coomassie (Invitrogen) secondo le raccomandazioni del produttore.

Le VLP sono state valutate mediante microscopia elettronica. I campioni di VLP sono stati posti su griglie di carbonio, lavati brevemente in acqua e macchiati negativamente con acetato di uranile e lasciati asciugare. Le griglie sono state visualizzate e sottoposte a imaging su un Technai™ G2 Spirit BioTWIN TEM.

20 Un metodo alternativo di purificazione di VP1-VLP di JCV è presentato di seguito, nell'Esempio 7.

Esempio 2: esempio di un saggio anticorpale HPVLP non rivendicato come invenzione

Un saggio sensibile per gli anticorpi anti-JCV è stato sviluppato utilizzando gli HPVLP e può essere utilizzato in connessione con il saggio di conferma che è il metodo rivendicato. Nel
25 presente documento viene descritto e denominato saggio HPVLP. In un esempio di analisi, sono

state preparate piastre per microtitolazione a 96 pozzetti aggiungendo una soluzione contenente HPVLP a una concentrazione di 1 µg/mL e incubando la piastra durante la notte a 4 °C. I pozzetti sono stati risciacquati con tampone diluente e poi bloccati per un'ora a temperatura ambiente con tampone di bloccaggio della caseina e risciacquati con tampone diluente. I

5 controlli del saggio e i campioni di siero o plasma sono stati diluiti 1:200 nel diluente di saggio. I campioni e i controlli diluiti sono stati addizionati ai pozzetti e incubati per un'ora a temperatura ambiente e lavati con tampone diluente. Il rilevamento è stato eseguito utilizzando anticorpo anti-HRP umana (IgG) di asino, che è stato addizionato ai pozzetti e incubato a temperatura ambiente per un'ora. Le piastre sono state quindi lavate ed è stato addizionato il

10 tampone TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) (Chromagen, Inc., San Diego, CA). Dopo uno sviluppo per un tempo adatto a consentire lo sviluppo del colore (circa 20 minuti), la reazione è stata interrotta con 1 N di H₂SO₄ e l'assorbanza è stata letta a 450 nm. I livelli di anticorpo anti-JCV nei campioni sono stati espressi come unità OD.

Il saggio è stato interpretato come descritto di seguito utilizzando le unità OD per

15 determinare i livelli.

Se campioni sconosciuti hanno prodotto un'inibizione competitiva superiore al 40% del legame con HPVLP in soluzione, il campione è stato considerato JCV+ (JCV positivo), con un'inibizione del <40% valutata come JCV- (JCV negativo).

Inizialmente, i campioni con valori OD maggiori dell'OD del punto di taglio (controllo

20 negativo medio OD× 1,23) sono stati definiti positivi per la presenza di anticorpi anti-JCV, mentre campioni con valori OD uguali o inferiori all'OD del punto di taglio sono stati definiti negativi.

I controlli utilizzati nel saggio sono stati selezionati in base alla OD bersaglio e alla specificità [come determinato nel saggio di conferma secondario per specificità (descritto *infra*)]

25 e ha incluso un controllo positivo 1, che erano sieri di donatore in pool con elevata reattività nel

saggio definiti come aventi un valore OD bersaglio di circa 1,0 e per specificità, in competizione con JCV>80%; controllo positivo 2, che conteneva sieri di donatori in pool con reattività inferiore nel saggio definiti con un valore OD bersaglio di circa 0,25 nel saggio e per specificità, in competizione con JCV>80% e controllo negativo, che erano sieri di donatore in pool con reattività simile al controllo tampone nel saggio con un valore OD bersaglio di circa 0,07 (si noti che il tampone del saggio ha un valore OD di circa 0,045).

In alcuni casi, è stato condotto un saggio di titolazione in cui campioni positivi sono stati testati a più diluizioni e la massima diluizione che ha dato un valore di OD maggiore dell'OD di punto di taglio è stata definita come il titolo IgG di JCV.

I saggi sono stati convalidati dal punto di vista della specificità, precisione, interferenza della matrice, robustezza e stabilità dei reagenti.

Esempio 3: saggio di conferma secondario

Nel metodo secondo l'invenzione è stato eseguito, oltre al saggio descritto *sopra, anche un saggio di conferma secondario (saggio secondario)*. Nel saggio di conferma, i campioni (plasma o siero) sono stati incubati con HPVLP (concentrazione finale di VLP = 1 µg/mL, diluizione finale del campione = 1:200) per un'ora a temperatura ambiente prima dell'uso nel saggio. I campioni di controllo sono stati incubati in tampone di saggio e non in presenza di HPVLP. Il saggio è stato quindi condotto come descritto in precedenza. La percentuale di inibizione di nOD₄₅₀ è stata calcolata come: % inibizione = $100 \times [1 - (\text{nOD}_{450} \text{ media}) (\text{campioni preincubati con JCV MAD-1 VLP}) \div (\text{nOD}_{450} \text{ media}) (\text{campioni incubati con tampone})]$.

Se i risultati del saggio erano gli stessi dopo pre-incubazione con tampone come nel saggio primario (*vale a dire*, circa la stessa OD), allora il campione è stato interpretato negativo per la presenza di anticorpi anti-JCV specifici. Se i risultati del saggio erano inferiori dopo la pre-incubazione con HPVLP (*vale a dire*, nel saggio secondario), il campione è stato interpretato come contenente anticorpi anti-JCV specifici.

Esempio 4: algoritmo del punto di taglio del saggio di screening/conferma

Il test sierologico (test degli anticorpi anti-JCV) è stato configurato come saggio in due fasi: un ELISA di screening e un ELISA supplementare di conferma (saggio secondario).

Per il confronto dei risultati tra piastre di saggio e analisi, i risultati del campione sono stati normalizzati al valore di densità ottica (OD₄₅₀) del controllo positivo sulla piastra e riportati come OD₄₅₀ normalizzata come descritto di seguito.

Per implementare l'utilità del saggio HPVP, sono stati ricavati punti di taglio utilizzando un modello di distribuzione a miscela di tre componenti di Weibull. In queste determinazioni sono state utilizzate le seguenti definizioni:

$$\text{OD normalizzata del saggio di screening (nOD)} = \frac{\text{avg(campione_OD_duplicati)}}{\text{avg(PC1_OD_replicati)}} ;$$

Ad esempio:

$$\text{Media (campione_OD_duplicati)} = 0,60$$

$$\text{Media (controllo positivo 1 OD_replicati)} = 1,20$$

$$\text{OD normalizzata} = 0,60/1,20=0,50.$$

Per il saggio di conferma

$$\% \text{ di inibizione del saggio di conferma} = 100\% \times \left(1 - \frac{\text{competizione_campione_OD}}{\text{non competizione_campione_OD}}\right)$$

Nell'ELISA di conferma supplementare, l'HPVLP solubile è stata utilizzata per pre-adsorbire gli anticorpi ad alta affinità contro JCV in campioni prima della valutazione dei campioni nell'ELISA di screening. I risultati sono stati calcolati come percentuale di inibizione per determinare riduzioni della reattività nell'ELISA di screening dopo che i campioni sono stati pre-adsorbiti con HPVLP [% inibizione = 100 × [1 - (media nOD₄₅₀ campioni pre-incubati HPVLP) ÷ (media nOD₄₅₀ campioni incubati tampone)].

I tassi di falsi positivi e falsi negativi sono stati definiti come segue. Il tasso di falsi negativi è la proporzione di veri campioni positivi al virus JC che vengono determinati negativi

agli anticorpi mediante il saggio. Il tasso di sieropositivi è la proporzione di campioni determinati sieropositivi (*vale a dire*, aventi anticorpi anti-JCV come determinato usando l'algoritmo di punto di taglio di screening/conferma anti-JCV).

I dati sono stati analizzati utilizzando SAS v9. I dati che non mostravano una
5 distribuzione normale sono stati analizzati mediante il test U di Mann-Whitney. I dati categoriali sono stati analizzati utilizzando il test χ^2 di Pearson o il test esatto di Fisher in base alla dimensione del campione. Il coefficiente di correlazione di Pearson è stato utilizzato per valutare la relazione tra nOD₄₅₀ e i livelli di DNA di JCV nelle urine. Tutti i test sono stati
10 bilaterali a un livello alfa di 0,05. I limiti di confidenza per la sieroprevalenza e i tassi di falsi negativi sono stati ottenuti con il metodo percentile bootstrap (6) utilizzando 10.000 bootstrap.

Esempio 4(a): reattività sierologica al JCV

È stato condotto uno studio per stabilire un saggio per rilevare gli anticorpi anti-JCV in
pazienti affetti da SM e per condurre una valutazione preliminare della potenziale utilità clinica
del saggio per la stratificazione del rischio di PML. Per caratterizzare le risposte anticorpali
15 contro gli agenti infettivi nell'uomo, è stato fondamentale avere sieri di riferimento sia da individui infetti sia non infetti. Sebbene la natura asintomatica dell'infezione da JCV renda impossibile identificare individui "veri" negativi, i Richiedenti sono stati in grado di identificare una popolazione di individui "veri" positivi misurando il DNA di JCV nelle urine di individui "uro-positivi".

20 I livelli di DNA di JCV nelle urine [raccolte nel protocollo di sperimentazione clinica STRATA (reiniziazione con natalizumab del dosaggio)] sono stati determinati mediante un saggio quantitativo in tempo reale della reazione a catena della polimerasi (q-PCR) (ViraCor Laboratories, Lee's Summit, MO) con un limite di quantificazione di 500 copie/mL e limite di rilevamento di 50 copie/mL.

25 Lo stato anticorpale anti-JCV di 831 campioni di siero di pazienti SM, che

comprendevano campioni da 204 pazienti uro-positivi a JCV, è stato inizialmente valutato per gli anticorpi anti-JCV in un ELISA di screening per determinare la distribuzione delle risposte sierologiche. I risultati del saggio in base allo stato del DNA nelle urine hanno mostrato la presenza di due popolazioni sovrapposte ma distinte di reattività IgC JCV (FIG. 1). Il livello medio di reattività per i pazienti con SM uro-positivi al DNA di JCV ($nOD_{450} = 0,895$) è stato significativamente più alto rispetto ai pazienti con SM uro-negativi al DNA di JCV ($nOD_{450} = 0,131$; $p < 0,001$) e nessun paziente uro-positivo ha mostrato reattività al saggio al di sotto di una nOD_{450} di 0,10. Pertanto, un punto di taglio inferiore del saggio è stato stabilito a nOD_{450} 0,10, in cui il tasso falso-negativo empirico nella zona negativa era 0%.

10 Molti pazienti senza DNA di JCV rilevabile nelle urine (uro-negativi) presentavano una reattività sierologica simile a quella dei pazienti uro-positivi. Questi risultati sono coerenti con l'ipotesi che un test del DNA di JCV nelle urine non riesca a rilevare tutti gli individui infetti da JCV.

Esempio 4(b): carico di DNA urinario del JCV e attività sierologica

15 Per affrontare la potenziale preoccupazione che pazienti infetti da JCV con bassi livelli di replicazione virale possano avere bassi livelli di anticorpi sierici che non vengono rilevati nel saggio sierologico (potenziali falsi negativi) è stata esaminata la correlazione tra i livelli virali e la reattività degli anticorpi. La FIG. 2 mostra i dati dei 204 pazienti STRATA uro-positivi a DNA di JCV e dimostra che non vi è alcuna relazione rilevabile tra livelli di DNA di JCV nelle urine e
20 livelli di anticorpi anti-JCV in campioni con nOD_{450} inferiore a 0,60 (coefficiente di correlazione di Pearson = 0,048, $p = 0,751$). Questo risultato è valido anche se l'urina e il siero sono stati raccolti allo stesso punto temporale dello studio STRATA (coefficiente di correlazione di Pearson = 0,002, $p = 0,993$). A $nOD_{450} > 0,60$, è stata osservata una correlazione più forte con una percentuale più elevata di campioni di siero da individui con elevate copie di DNA JCV/mL
25 aventi valori di NOD_{450} più elevati, coerentemente con le rassegne della letteratura (*ad esempio,*

Egli et al., J. Infect. Dis. 199:837-846, 2009). Questi dati suggeriscono che i risultati sieronegativi sono probabilmente dovuti all'assenza di infezione da JCV, anziché a livelli virali molto bassi.

Esempio 4(c): valutazione della reattività crociata BKV-JCV

5 È improbabile che l'assegnazione di un singolo punto di taglio conservativo che controlli il tasso di falsi negativi allo 0% escluda il rilevamento di anticorpi che reagiscono trasversalmente ad altri virus di polioma comuni (falsi positivi), come gli anticorpi anti-BKV, che condividono un'identità elevata con JCV nella proteina capsidica VP1. Inoltre, tale reattività incrociata degli anticorpi può verificarsi attraverso l'esposizione di epitopi virali conservati
10 quando l'HPVLP è direttamente rivestita sulla piastra ELISA. Poiché nell'uomo si può verificare una doppia infezione da BKV e JCV e non è possibile identificare in modo affidabile pazienti che siano stati infettati da BKV e non da JCV, il problema della reattività incrociata è stato esaminato nei conigli, una specie in cui l'infezione naturale con BKV o JCV non può verificarsi.

Conigli sono stati immunizzati con BKV mediante iniezione sottocutanea di proteine in
15 soluzione salina tamponata con fosfato senza adiuvante, seguita da tre iniezioni di richiamo per un periodo di tre mesi. I campioni di siero sono stati analizzati per il legame diretto con JCV o BKV mediante ELISA. Antisieri BKV VLP da conigli con immunizzazione BKV con alta affinità ($EC_{50} = 1:100.000$) e sottoposti a reattività incrociata con HPVLP con minore affinità ($EC_{50} = 1:5.000$). I sieri preimmuni non hanno mostrato reattività. I dati rappresentativi relativo
20 a un coniglio sono mostrati in FIG. 3.

Poiché gli anticorpi BKV hanno reagito in modo incrociato con JCV, producendo così un segnale falso positivo nel saggio anti-JCV (FIG. 3), una bassa reattività contro JCV negli esseri umani potrebbe rappresentare anticorpi anti-BKV a bassa affinità che reagiscono in modo incrociato con JCV per produrre segnali falso positivi.

25 **Esempio 4(d): misurazione della risposta anticorpale JCV specifica (ELISA di conferma**

supplementare)

Per distinguere i pazienti con anticorpi JCV specifici da quelli con anticorpi a reattività incrociata potenzialmente a bassa affinità, è stato sviluppato un ELISA di competizione utilizzando HPVLP solubile (saggio secondario). Si prevedeva che gli anticorpi di affinità più elevata JCV specifici fossero più efficacemente contrastati dall'antigene solubile, mentre gli anticorpi di affinità inferiore potrebbero staccarsi dai complessi formati con l'antigene JCV in soluzione e legarsi alla VLP di JCV rivestita sulla piastra ELISA. Un sottogruppo di 515 campioni di siero da pazienti uro-positivi (n = 204) e uro-negativi (n = 311) è stato sistematicamente e non proporzionalmente campionato per la valutazione nell'ELISA dopo pre-adsorbimento con VLP JCV solubile o tampone di saggio. Nelle FIGG. 4A e 4B, la reattività dei campioni di siero da pazienti uro-negativi o uro-positivi nei saggi di screening e conferma è indicata fianco a fianco. Campioni con una forte reattività a JCV sono stati altamente inibiti dal pre-adsorbimento di anticorpi con JCV solubile, mentre i campioni con bassi livelli di anticorpi anti-JCV hanno mostrato una competizione differenziale. Le risposte anticorpali nella maggior parte dei pazienti uro-positivi erano fortemente in competizione (FIG. 4B). Questi risultati supportano l'idea che una percentuale significativa della bassa reattività sierica a JCV possa essere dovuta alla reattività incrociata di anticorpi non specifici di JCV.

La distribuzione delle risposte sieriche nell'ELISA di conferma era costituita da due picchi definiti, separati in modo ottimale al 40% di inibizione (FIG. 5A) corrispondenti approssimativamente al 5° percentile inferiore della distribuzione della risposta dei campioni uropositivi (FIG. 5B). Pertanto, il livello di inibizione del 40% è stato selezionato come punto di taglio per l'ELISA di conferma.

Esempio 4(e): saggio sierologico anti-JCV finalizzato in due fasi

Combinando i saggi di screening e di conferma, la possibilità di rilevare campioni con anticorpi JCV specifici "veri" è notevolmente migliorata. Nell'analisi finale, i campioni con

valori $nOD_{450} < 0,10$ nell'ELISA di screening sono considerati negativi per gli anticorpi anti-JCV e quelli con valori $nOD_{450} > 0,25$ nell'ELISA di screening sono considerati positivi per gli anticorpi anti-JCV. Campioni con reattività tra i valori di NOD da 0,10 a 0,25 sono stati ulteriormente testati nell'ELISA di conferma. Nell'ELISA di conferma, tutti i campioni che
5 mostrano un'inibizione $> 40\%$ sono classificati come positivi (FIG. 4). A valori $nOD_{450} > 0,25$ la probabilità di osservare un'inibizione $> 40\%$ era approssimativamente del 95%.

Esempio 4(f): sieropositività JCV nella coorte STRATA e asso di falsi negativi

Sulla base dell'algoritmo di cui sopra, il tasso di sieroprevalenza nella popolazione STRATA è stato stimato del 53,6% con con limiti di confidenza del 95% determinati con
10 bootstrap compresi tra il 49,9% e il 57,3% [$0,536 = 0,451$ (probabilità nOD_{450} dell'ELISA di screening $> 0,25$) + $0,085$ (probabilità di nOD_{450} dell'ELISA di screening compresa tra 0,10 e 0,25 ed ELISA supplementare di conferma % - inibizione $>40\%$)]. Questo calcolo della sieroprevalenza presupponeva la conferma degli anticorpi anti-JCV in proporzioni uguali di
15 campioni di soggetti uropositivi e uronegativi nella regione nOD compresa tra 0,10 e 0,25 (percentuale di inibizione $>40\%$); questa ipotesi era supportata da un test esatto di Fisher a due code con un valore p di 0,702.

Dei 204 pazienti uro-positivi, cinque avevano nOD_{450} tra 0,10 e 0,25 e non si sono confermati come aventi anticorpi specifici anti-JCV (percentuale di inibizione $\leq 40\%$; FIG.4B).

Esempio 5: validazione del saggio

20 La convalida del saggio è stata eseguita da Focus Diagnostics, Inc. (Cypress, CA), in cui sono stati dimostrati i parametri di prestazione tra cui precisione, specificità, sensibilità e stabilità dei reagenti e dei controlli di saggio intra- e intra-saggio. Sono stati dimostrati i parametri delle prestazioni del saggio tra cui la precisione, la specificità, la sensibilità e la
25 stabilità dei saggi intra e intra-saggio dei reagenti e dei controlli del saggio. I parametri di precisione sono stati valutati da tre analisti indipendenti sia nel plasma sia nel siero in quattro

giorni diversi, utilizzando preparazioni indipendenti dei controlli del saggio. Per dimostrare la specificità del saggio, dieci singoli campioni di siero e plasma da volontari sani o pazienti con SM [TYSABRI® (natalizumab) naive] sono stati pre-incubati con un tampone o con una concentrazione definita di HPVLP o BKV VLP in soluzione. La robustezza è stata valutata
5 variando i limiti superiore e inferiore dei tempi di incubazione per le fasi di aggiunta del campione, del coniugato e del substrato e sono stati valutati diversi lotti di reagente di rivestimento HPVLP per dimostrare prestazioni del controllo del saggio coerenti. L'interferenza della matrice è stata valutata determinando il recupero percentuale in campioni arricchiti con concentrazioni predefinite di anticorpi anti-JCV e arricchendo i campioni contenenti anticorpi
10 specifici anti-JCV con concentrazioni variabili di anticorpi monoclonali umani irrilevanti.

Esempio 6: determinazione dello stato anticorpale JCV in pazienti PML

Campioni di plasma e siero (singoli punti temporali selezionati casualmente da collezioni seriali) sono stati ottenuti da un totale di 831 pazienti dallo studio STRATA (Safety of TYSABRI Re-dosing and Treatment). STRATA è uno studio multinazionale aperto a braccio
15 singolo (Nord America, Europa, Australia e Nuova Zelanda) in cui tutti i pazienti ricevono Natalizumab 300 mg per infusione endovenosa ogni 4 settimane per 48 settimane. I campioni di urina raccolti secondo il protocollo STRATA sono stati analizzati per la presenza di DNA di JCV.

Dall'approvazione commerciale di TYSABRI® nel giugno 2006 al 9 febbraio 2010 sono
20 stati segnalati 35 casi di PML in trattamento con natalizumab. Inoltre, vi sono stati tre casi di PML negli studi clinici di pre-approvazione di natalizumab (10, 13, 25). I campioni conservati sono stati ottenuti dal maggior numero possibile di casi di PML da punti temporali precedenti alla diagnosi di PML (pre-PML). I campioni di plasma o di siero erano disponibili solo da 11 pazienti con PML trattati con natalizumab (10 pazienti con SM e 1 paziente con malattia di
25 Crohn: Tabella 1). Sono stati testati campioni di siero che sono stati ottenuti da uno a tre anni

prima della diagnosi di PML. Quasi tutti questi campioni sono stati raccolti da pazienti che hanno partecipato a registri o studi clinici e sono stati conservati a -70 °C fino all'analisi. In particolare, gli anticorpi anti-JCV sono stati rilevati in tutti gli 11 pazienti (100%) tramite la combinazione dell'ELISA di screening dello stato sierologico e dell'ELISA di conferma supplementare (FIGG. 6A e 6B) descritte in precedenza. Utilizzando un test esatto di Fisher di un campione, questo risultato era significativamente diverso dalla proporzione prevista (53,6%) con un valore p di 0,002.

Questi dati indicano che il saggio della presente invenzione può essere utilizzato per determinare la presenza o assenza di anticorpo anti-JCV in soggetti come parte di una valutazione complessiva del rischio di contrarre PML.

Tabella 1. Campioni di 11 pazienti con PML trattati con Natalizumab che avevano disponibili campioni di sangue precedenti alla diagnosi.

Soggetto	Fonte	Geografia	Diagnosi di PML (data)	Esposizione a Natalizumab		Uso di immunosoppressore	
				No. di dosi	Dose finale	Tipo	Durata
1	Studio clinico*	Belgio	Marzo 2005	5 dosi	Giugno 2003	Infliximab Azatioprina	32 mesi 73 mesi
2	Studio clinico (SENTINEL)	Stati Uniti	Febbraio 2005	28 dosi	Dicembre 2004	Nessuno	
3	Studio clinico (SENTINEL)	Stati Uniti	Febbraio 2005	37 dosi	Gennaio 2005	Nessuno	
4	Post-commercializzazione	Svezia	Luglio 2008	17 mesi	Giugno 2008	Nessuno	
5	Studio clinico (STRATA)	Germania	Giugno 2009	34 dosi	Aprile 2009	Mitoxantrolone	11 mesi
6	Studio clinico (STRATA)	Francia	Giugno 2009	35 dosi	Maggio 2009	Mitoxantrolone	10 mesi
7	Post-commercializzazione	Svezia	Giugno 2009	29 mesi	Giugno 2009	Nessuno	
8	Post-commercializzazione	Svizzera	Agosto 2009	28 dosi/25 mesi	Giugno 2009	Mitoxantrolone Azatioprina	18 mesi 21 mesi

Soggetto	Fonte	Geografia	Diagnosi di PML (data)	Esposizione a Natalizumab		Uso di immunosoppressore	
				No. di dosi	Dose o finale mesi	Tipo	Durata
9	Post-commercializzazione	Svizzera	Ottobre 2009	36 mesi	Settembre 2009	Mitoxantrolone	4 anni
10	Studio clinico (STRATA)	Repubblica Ceca	Ottobre 2009	44 dosi	Settembre 2009	Azatioprina	3 mesi
11	Post-commercializzazione	Stati Uniti	Ottobre 2009	33 dosi	Settembre 2009	Metotrexato	Sconosciuta

*Malattia di Crohn; SENTINEL = Sicurezza ed efficacia del Natalizumab in combinazione con l'interferone beta-1a nei pazienti con sclerosi multipla recidivante-remittente; STRATA = Sicurezza del nuovo dosaggio e del trattamento con TYSABRI; qd = 4 × giorno; qwk = 1 × settimana
SENTINEL = Sicurezza ed efficacia del natalizumab in combinazione con interferone beta-1a nei pazienti con sclerosi multipla recidivante-remittente; STRATA = Sicurezza del nuovo dosaggio e del trattamento con TYSABRI®; ROW = Resto del mondo; qd = 4 × giorno; qwk = 1 × settimana; *Sia il trattamento precedente sia quello concomitante con natalizumab

Sono stati anche valutati i dati longitudinali di altri soggetti che assumevano un immunomodulatore (cioè, più campioni raccolti in momenti diversi da un singolo individuo). I dati longitudinali hanno indicato che, a differenza del test di eliminazione intermittente del DNA urinario, il saggio HPVLP può essere utilizzato in modo affidabile per valutare lo stato degli anticorpi anti-JCV e che lo stato degli anticorpi anti-JCV rimane relativamente stabile (in assenza di infezione *de novo*).

Esempio 7: metodo alternativo di purificazione JCV VP1-VLP

Questo metodo è un esempio di alternativa al metodo di gradiente di densità/ultracentrifugazione descritto in precedenza per la purificazione di JCV VP1-VLP da cellule di insetto. Le fasi generali del protocollo sono lisi, trattamento con benzonasi, precipitazione di desossicolato, precipitazione di solfato di ammonio e concentrazione/diafiltrazione, con una fase finale di scambio ionico utilizzando il fractogel TMAE.

Cellule Sf9 infettate con il baculovirus JCV-VP1 sono state lisate in PBS, 0,1 mM di CaCl₂ passando due volte attraverso un disgregatore cellulare a microfluidificazione a 5.000 psi.

I detriti cellulari sono stati rimossi mediante centrifugazione a bassa velocità e il surnatante trattato con 40 unità/mL di benzonasi (EMD Biosciences 71206-3) per 1 ora a temperatura ambiente. Per la fase di precipitazione di desossicolato, al lisato è stato aggiunto un decimo di volume del 2,5% di desossicolato (lo 0,25% di desossicolato finale) e il lisato è stato incubato a 5 37 °C per 1 ora con agitazione delicata. Un volume uguale di 4 M di NaCl, 0,1 mM di NaCl è stato aggiunto al lisato e il lisato è stato incubato su ghiaccio per 1 ora. Il precipitato è stato rimosso mediante centrifugazione a bassa velocità. Il surnatante è stato poi precipitato con il 40% di solfato di ammonio per rimuovere le proteine contaminanti. L'ultimo 40% è stato ottenuto utilizzando 232 g di solfato di ammonio solido per litro di soluzione. Miscelando 10 delicatamente la soluzione a 4 °C, è stato addizionato solfato di ammonio, un quinto alla volta, consentendo a ciascuna aggiunta di disciogliersi per 10-15 minuti prima di aggiungere la frazione successiva. La soluzione è stata agitata delicatamente durante la notte a 4 °C. Il precipitato di solfato di ammonio è stato rimosso mediante centrifugazione a bassa velocità e il surnatante contenente VP1 è stato filtrato utilizzando un filtro da 0,45 µm e portato alla fase 15 successiva. La soluzione è stata concentrata da 5 a 10 volte utilizzando una membrana TFF da 100 kDa NMWL (Mini UF Pellicon 2 Biomax-100 C 0,1 m², P2B100C01) e scambiata in tampone di assemblaggio (25 mM di tris, 150 mM di NaCl, 1 mM di CaCl₂, pH 7,5) diluendo 5 volte e concentrando nuovamente al volume iniziale due volte. La soluzione è stata conservata a 4 °C per >= 36 ore. La soluzione è stata poi diafiltrata utilizzando una membrana TFF da 500 20 kDa NMWL (Mini UF Pellicon 2 Biomax-500 V, Millipore n. parte P2B500V01) utilizzando tampone cromatografico TMA a 40 volumi (25 mM di tris, 150 mM di NaCl, 0,1 mM di CaCl₂, pH 8,0). Per la cromatografia, è necessario circa 1 mL di resina per 2 g di massa cellulare iniziale. La proteina è stata caricata sulla colonna TMAE di dimensioni appropriate (Fractogel® EMD TMAE HiCap (M) - EMD Biosciences cat. 1.10316) e lavata con 3 volumi di colonna di 25 tampone cromatografico. Le VLP sono state eluite con 25 mM di tris, 600 mM di NaCl, 0,1 mM

di CaCl₂, pH 8,0. La purezza della VP1 è stata valutata mediante SDS-PAGE e spettrometria di massa, la presenza di VLP è stata confermata mediante microscopia elettronica e la percentuale di proteina totale sotto forma di VLP è stata determinata mediante ultracentrifugazione analitica della velocità di sedimentazione. Questo metodo ha portato a preparazioni HPVLP di circa

5 l'80% di HPVLP.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo in vitro per identificare un soggetto a rischio di sviluppare leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML) comprendente un saggio primario e secondario;

in cui il saggio primario comprende:

- (a) mettere a contatto un campione biologico ottenuto da un soggetto con particelle VP1 altamente purificate (HPVLP), costituite prevalentemente dalla proteina VP1 del JCV, immobilizzate su un substrato solido in condizioni adatte a legare un anticorpo del virus JC (JCV) nel campione a un HPVLP;
- (b) rilevare il livello di legame dell'anticorpo JCV nel campione agli HPVLP; e
- (c) correlare il livello rilevato con un livello di riferimento derivato da un campione di controllo o da un set di campioni che viene elaborato con il campione del soggetto;

e in cui il saggio secondario comprende:

- (a) mettere una porzione del campione biologico ottenuto da un soggetto a contatto con particelle virus-simili altamente purificate (HPVLP), costituite prevalentemente dalla proteina VP1 del JCV, in soluzione in condizioni adatte per il legame di un anticorpo anti-JCV nel campione a una HPVLP, fornendo in tal modo un campione pre-incubato;
- (b) mettere il campione pre-incubato a contatto con HPVLP, costituite prevalentemente dalla proteina VP1 del JCV, immobilizzate su un substrato solido in condizioni adatte per il legame di un anticorpo anti-JCV nel campione a una HPVLP;
- (c) rilevare il livello di anticorpo anti-JCV nel legame del campione pre-incubato alle HPVLP immobilizzate; e
- (d) confrontare il livello rilevato di anticorpo anti-JCV nel campione biologico pre-incubato con il livello di anticorpo anti-JCV rilevato in un campione biologico ottenuto dal soggetto che è stato pre-incubato in una soluzione senza HPVLP ed è stato messo a contatto con HPVLP immobilizzate su un substrato solido in condizioni adatte per il legame di un anticorpo anti-

- JCV nel campione a una HPVLP,
in cui gli HPVLP sono composti da più di 5, almeno 50, 150 o 360 polipeptidi VP1; in cui una diminuzione del livello rilevato di anticorpi JCV nel campione biologico preincubato rispetto al campione biologico ottenuto dal soggetto che è stato preincubato in una soluzione senza HPVLP indica che il campione è positivo per gli anticorpi JCV e il soggetto è a maggior rischio di sviluppare PML,
e una variazione nel livello rilevato di anticorpi JCV al di sotto di una percentuale specificata indica che nel campione non è presente alcun anticorpo specifico JCV.
2. Il metodo della rivendicazione 1, in cui mettere il campione biologico a contatto con HPVLP in soluzione è per un periodo di tempo selezionato tra 30 minuti, un'ora o per una notte a 4 °C.
 3. Il metodo della rivendicazione 1, in cui la percentuale specificata è del 40% e il metodo utilizza un ELISA HPVLP.
 4. Il metodo della rivendicazione 1, in cui la percentuale specificata viene selezionata per fornire un tasso di falsi negativi del 3% o inferiore per il rilevamento di anticorpi anti-JCV nel campione ottenuto dal soggetto.
 5. Il metodo della rivendicazione 1, in cui la percentuale specificata viene selezionata per fornire un tasso di falsi negativi del 1% o inferiore per il rilevamento di anticorpi anti-JCV nel campione ottenuto dal soggetto.
 6. Il metodo della rivendicazione 1, in cui il campione biologico ottenuto dal soggetto è classificato come negativo per l'anticorpo anti-JCV quando il livello di anticorpo anti-JCV nel campione biologico pre-incubato che si lega alle HPVLP immobilizzate è approssimativamente uguale al livello di anticorpo anti-JCV rilevato nel campione biologico ottenuto dal soggetto che è stato pre-incubato in una soluzione senza HPVLP.
 7. Il metodo della rivendicazione 1, in cui le HPVLP contengono più di 1, almeno 5, 10, 20, 30,

40, 50, 60, 70 o 72 pentameri VP1.

8. Il metodo della rivendicazione 1, in cui:

- (i) una HPVLP comprende inoltre almeno una tra una VP2 di JCV o una VP3 di JCV; o
- (ii) la VP1 in una HPVLP è una VP1 ricombinante; o
- (iii) almeno una VP1 nella HPVLP è una VP1 mutante.

9. Il metodo della rivendicazione 1, in cui il campione biologico è siero.

10. Il metodo della rivendicazione 1, in cui il campione biologico proviene da un soggetto a cui è stato prescritto un immunomodulatore o da un soggetto che sta valutando di assumere un immunomodulatore, in cui l'immunomodulatore è selezionato tra una terapia anti-VLA-4 e una terapia anti-CD20, una terapia anti-CD11a o micofenolato mofetile.

11. Il metodo della rivendicazione 10, in cui al soggetto a cui è stato prescritto un immunomodulatore o che sta considerando di assumere un immunomodulatore non è stato precedentemente somministrato l'immunomodulatore.

12. Il metodo della rivendicazione 10, in cui il soggetto ha precedentemente ricevuto una o più dosi di immunomodulatore.

13. Il metodo della rivendicazione 1, in cui il rilevamento di anticorpo anti-JCV che si lega alle HPVLP indica che il soggetto:

- (i) non è candidato a ricevere un trattamento con un immunomodulatore se il campione biologico è positivo per un anticorpo anti-JCV; o
- (ii) è candidato a ricevere un trattamento con un immunomodulatore e un monitoraggio avanzato di sintomi avversi durante il trattamento con l'immunomodulatore, opzionalmente in cui i sintomi avversi indicano lo sviluppo di PML.

14. Il metodo della rivendicazione 1, in cui il mancato rilevamento dell'anticorpo anti-JCV che si lega alle HPVLP indica che il soggetto è candidato a ricevere un trattamento con un immunomodulatore.

15. Il metodo della rivendicazione 1, in cui un soggetto avente un campione biologico determinato privo di anticorpi anti-JCV in un test iniziale viene riesaminato almeno annualmente per la presenza di anticorpi anti-JCV dopo il test iniziale.
16. Il metodo della rivendicazione 1, in cui il soggetto che in una prima data è stato determinato mediante il metodo della rivendicazione 1 come avente anticorpi anti-JCV viene riesaminato in una data successiva per determinare se il soggetto non ha anticorpi anti-JCV.
17. Il metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 10-14, in cui l'immunomodulatore è natalizumab.
18. Il metodo della rivendicazione 1, in cui il soggetto ha la sclerosi multipla (SM) o la malattia di Crohn (CD).

* * * *

Seguono n° 6 tavole di disegno.

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

Brescia, 14 febbraio 2025

In Fede,


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

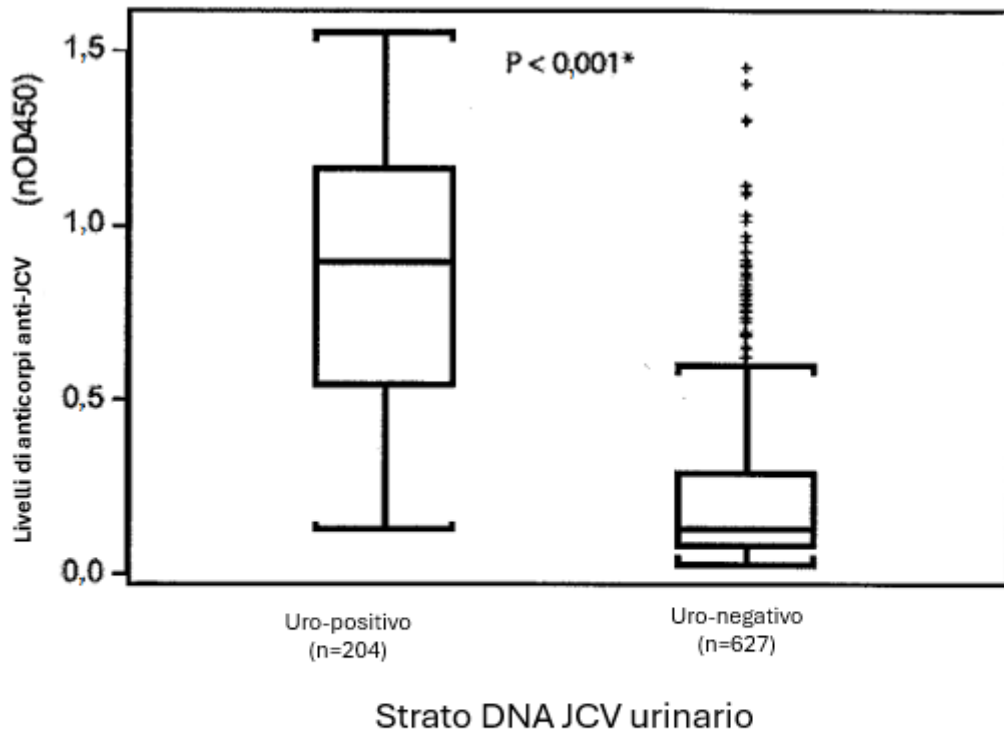


FIG. 1

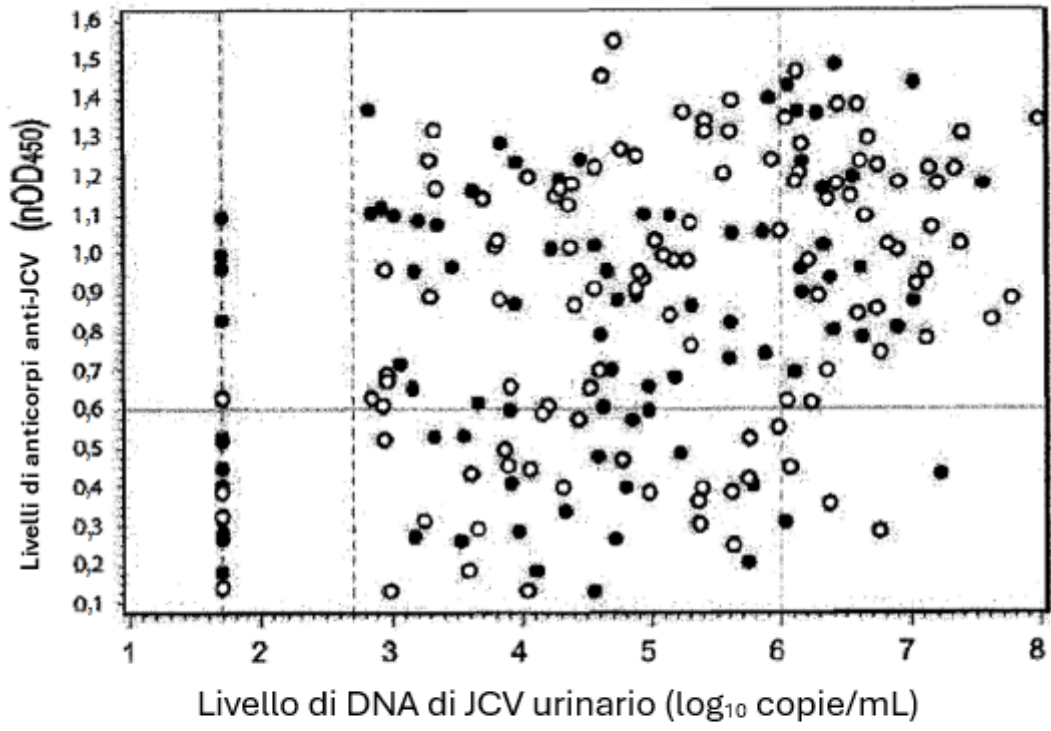


FIG. 2

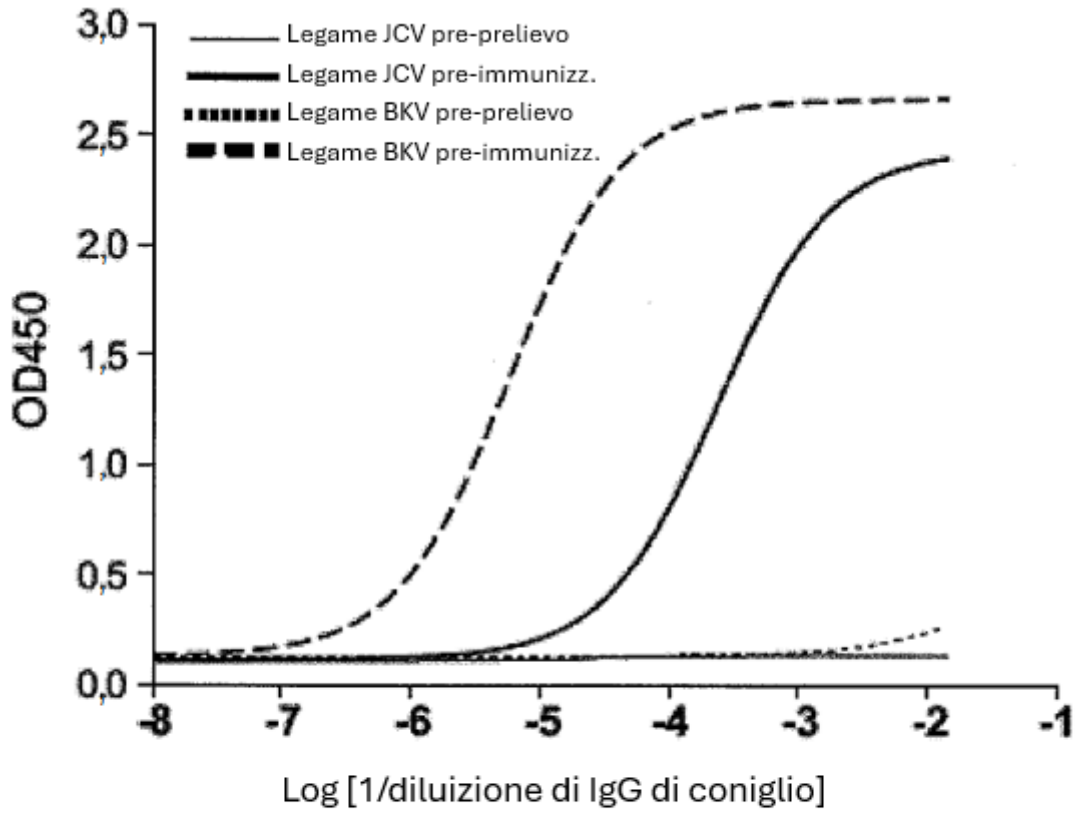


FIG. 3

FIG. 4A

Uro-negativo (n=311)

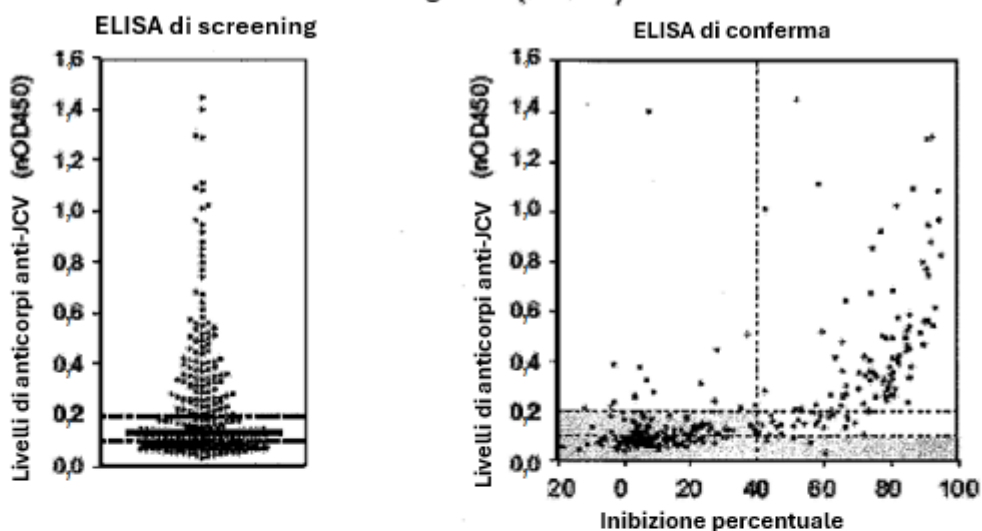


FIG. 4B

Uro-positivo (n=204)

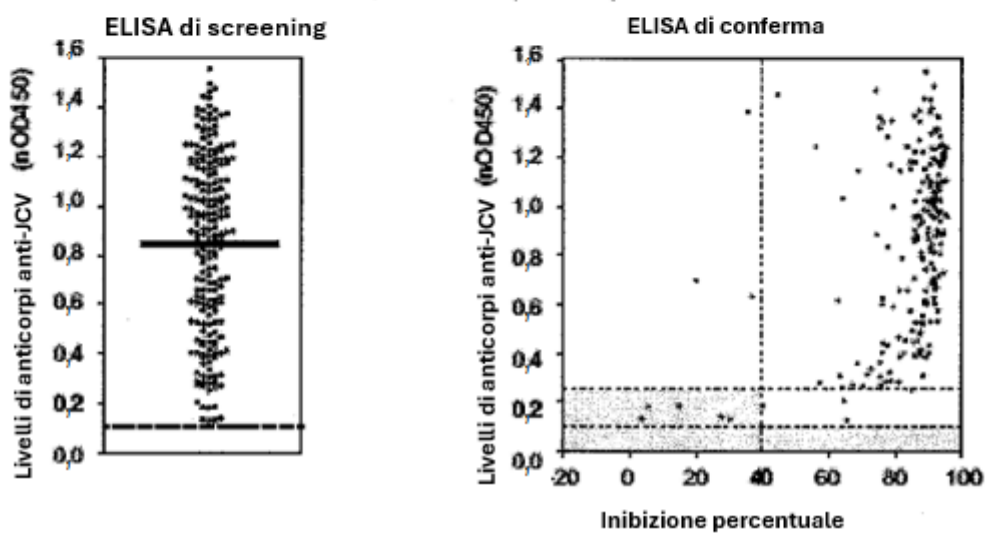


FIG. 5A.

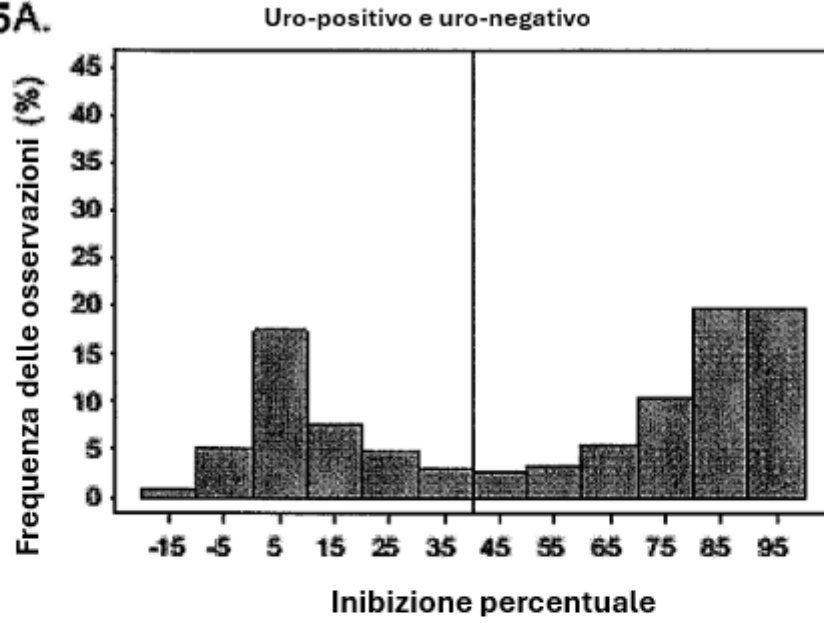


FIG. 5B.

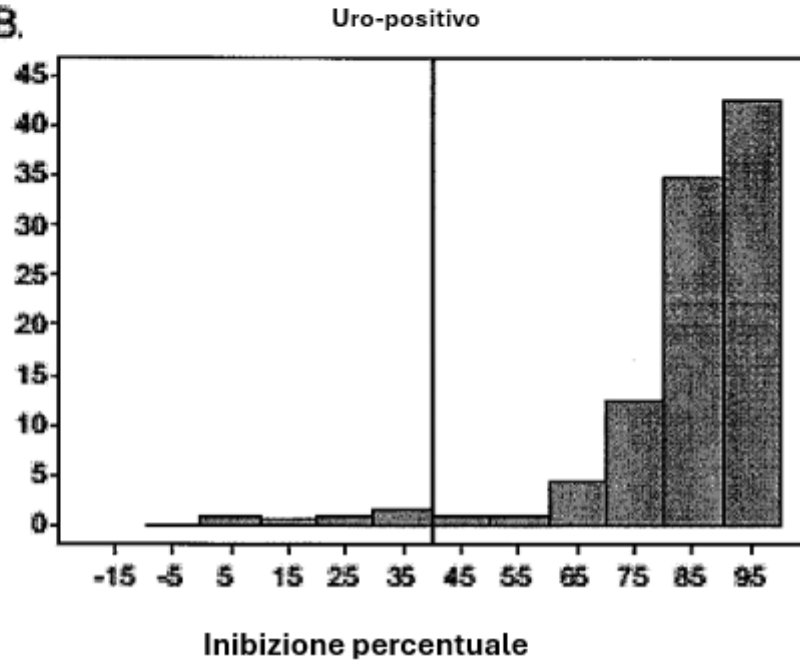


FIG. 6A. ELISA di screening

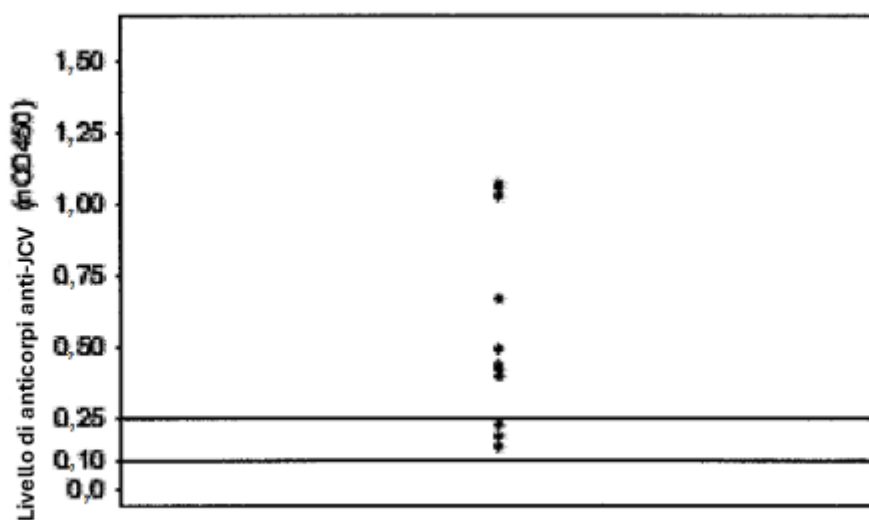


FIG. 6B. ELISA di conferma

