



Ministero delle Imprese e del Made in Italy

Ricevuta di presentazione

per

Brevetto per invenzione industriale

Domanda numero: 102023000024003

Data di presentazione: 13/11/2023

DATI IDENTIFICATIVI DEL DEPOSITO

Ruolo	Mandatario
Depositante	valeria ghirardi
Data di compilazione	13/11/2023
Riferimento depositante	ITPF9835/IT
Titolo	PEPTIDI SINTETICI E LORO USO IN DIAGNOSTICA PER RILEVARE GLI ANTICORPI CONTRO IL VIRUS POLIOMA DELLE CELLULE DI MERKEL (MCPYV)
Carattere domanda	Ordinaria
Esenzione	NO
Accessibilità al pubblico	NO
Numero rivendicazioni	24
Autorità depositaria	

PRIVACY

Dichiaro di aver letto e compreso l'informativa sul trattamento dei dati personali trasmessi con il presente deposito, resa ai sensi dell'art. 13 del Regolamento (UE) 2016/679 e pubblicata all'interno del presente portale, oltre che sul sito istituzionale della Direzione Generale per la Tutela della Proprieta' Industriale Ufficio Italiano Brevetti e Marchi del Ministero delle Imprese e del Made in Italy

RICHIEDENTE/I

Natura giuridica	Persona giuridica
Denominazione	UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FERRARA
P.IVA/CF	00434690384
Tipo Società	le universita'
Nazione sede legale	Italia
Comune sede legale	Ferrara (FE)

Indirizzo	Via Ludovico Ariosto
Civico	35
CAP	44121
Telefono	
Fax	
Email	
Pec	
Quota percentuale	100.0%

DOMICILIO ELETTIVO

Cognome/R.sociale	De Simone & Partners S.r.l.
Indirizzo	via V. Bellini 20
Cap	00198
Nazione	Italia
Comune	Roma (RM)
Telefono	06 - 853361
Fax	06 - 85831764
Email\PEC	patent@pec.desimonepartners.com

MANDATARI/RAPPRESENTANTI

Cognome	Nome
Ghirardi	Valeria
Fioruzzi	Maria Augusta
Pace Napoleone	Maria

INVENTORI

Cognome	Nome	Nazione residenza
Tognon	Mauro	Italia
Martini	Fernanda	Italia

Rotondo	John Charles	Italia
Mazziotta	Chiara	Italia
Tramarin	Maria Letizia	Italia
Cervellera	Christian Felice	Italia
Badiale	Giada	Italia

CLASSIFICAZIONI

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
---------	--------	-------------	--------	-------------

NUMERO DOMANDE COLLEGATE

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

Tipo documento	Riserva	Documento
Sequenza di nucleotidi o aminoacidi	NO	ITPF9835IT - sequence listing.xml hash: d0d3497d0c0ca0d843331c2dce887777
Descrizione in italiano*	NO	ITPF9835IT - Descrizione.pdf.p7m hash: b78bc377e7e86e65cce5bb5df457814b
Riassunto	NO	ITPF9835IT - Riassunto.pdf.p7m hash: 3200614d92ad7ffe842e839647732c0
Rivendicazioni	NO	ITPF9835IT - Rivendicazioni.pdf.p7m hash: de69b5c8ba20167b4dbe455bdfdb9efc
Disegni	NO	ITPF9835IT - Figure final.pdf.p7m hash: 63064a0aabf112aaf6191277b6e874ed
Rivendicazioni in inglese	SI	hash:
Lettera di Incarico	SI	hash:

PAGAMENTI

Tipo	Identificativo	Data
------	----------------	------

Bollo

01201976831981

18/11/2021

ESENZIONI INDICATE

Esenzione
su diritti e
tasse

DM 02/04/2007 - art. 2: esonero dal pagamento dei diritti di deposito e di trascrizione relativamente ai brevetti per invenzioni industriali, e modelli di utilita' a vantaggio di: Universita'; Amministrazioni Pubbliche aventi fra i loro scopi istituzionali finalita' di ricerca; Amministrazioni della Difesa; Amministrazioni delle Politiche Agricole, alimentari e forestali.

DOVUTO

Gli importi indicati non tengono conto delle eventuali esenzioni applicabili

Importo Tasse:

€ 680,00

Importo Imposta Bollo:

€ 16,00

NOTE

PEPTIDI SINTETICI E LORO USO IN DIAGNOSTICA PER RILEVARE GLI ANTICORPI CONTRO IL VIRUS POLIOMA DELLE CELLULE DI MERKEL (MCPYV)

RIASSUNTO

La presente invenzione si riferisce a peptidi isolati corrispondenti ad almeno un epitopo degli
5 antigeni T grande (LT) e/o T piccolo (sT) del virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV)
e al loro utilizzo in un metodo per il rilevamento di anticorpi contro il virus polioma delle
cellule di Merkel in un campione isolato di fluido biologico. Un kit diagnostico per la
determinazione della presenza di anticorpi contro il virus polioma delle cellule di Merkel
(MCPyV) in un campione di fluido biologico isolato che utilizza detti peptidi è anch'esso un
10 oggetto dell'invenzione.

PEPTIDI SINTETICI E LORO USO IN DIAGNOSTICA PER RILEVARE GLI ANTICORPI CONTRO IL VIRUS POLIOMA DELLE CELLULE DI MERKEL (MCPyV)

SETTORE DELL'INVENZIONE

La presente invenzione appartiene al settore dell'immunodiagnostica.

- 5 In particolare, l'invenzione si riferisce a immunosaggi per rilevare nel siero gli anticorpi contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV), a peptidi sintetici lineari corrispondenti ad epitopi degli antigeni T grande (LT) e T piccolo (sT) di MCPyV e ai loro usi diagnostici.

STATO DELLA TECNICA ANTERIORE

10 Il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) è un piccolo virus oncogeno a DNA appartenente alla famiglia dei poliomaviridae [3,9]. MCPyV è considerato l'unico tra i virus polioma ad avere attività oncogena nell'uomo [10]. La sua attività oncogena è stata infatti associata all'insorgenza e progressione del carcinoma delle cellule di Merkel (CCM). MCPyV è attualmente considerato dall'Organizzazione mondiale della sanità/Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (WHO/IARC) come agente cancerogeno del gruppo 2A (probabilmente cancerogeno per l'uomo). Il
15 genoma bicatenario a DNA di MCPyV comprende tre domini funzionali: uno precoce, uno tardivo e la Non coding control region (NCCR) [11]. La regione tardiva contiene i geni codificanti per le proteine strutturali denominate proteine virali ("Viral protein") 1 e 2 (VP1 e VP2). La regione precoce contiene i geni che codificano per le proteine oncogene virali denominate antigeni T grande (large T, LT), T piccolo (small T, sT), e antigeni di 57kT. Nel 2013 è stato inoltre identificato un gene
20 codificante per la proteina "Alternative frame of the large T ORF" (ALTO) [11]. Similmente ad altri virus polioma umani, le proteine oncogene LT ed sT di MCPyV contengono una serie di motivi e domini funzionali che svolgono ruoli chiave nella replicazione e trascrizione del genoma virale [10]. È stato dimostrato che gli eventi chiave dell'attività oncogena del virus MCPyV comprendono l'integrazione del genoma virale nel genoma della cellula ospite, l'espressione incontrollata delle
25 proteine oncogene LT e sT e la regione codificante per il gene LT troncata [10].

Il CCM è un raro ma altamente aggressivo tumore epiteliale di origine neuroendocrina [12] con un'incidenza annuale di circa 2,4 e 3 casi ogni milione di individui all'anno, rispettivamente in Europa e negli USA. Il CCM presenta un tasso di mortalità a 5 anni di circa il 63%, mentre un terzo dei pazienti, alla diagnosi primaria, presenta metastasi ai linfonodi o locoregionali [9]. Il CCM insorge
30 più frequentemente in persone anziane con un'età media di insorgenza di 69 anni, soggetti bianchi di entrambi i generi con una storia pregressa di una lunga esposizione ai raggi UV del sole. Il tumore ha quindi una predilezione d'insorgenza nelle regioni anatomiche più esposte al sole, specialmente nella

regione della testa e del collo [9]. Grazie allo sviluppo di nuove tecniche diagnostiche e all' aumento della popolazione anziana, il tasso di incidenza riportato è costantemente aumentato negli ultimi decenni.

Un fattore di rischio importante nello sviluppo del CCM è rappresentato dall'immunosoppressione/immunocompromissione [1], tanto da aumentare il rischio relativo di ben 16 volte rispetto alla popolazione sana [13]. Infatti, circa il 10% dei pazienti affetti da CCM mostra deficit immunitari. I pazienti immunosoppressi sono particolarmente più inclini in generale a sviluppare tumori virus-associati, tra cui il sarcoma di Kaposi e il linfoma di Burkitt, neoplasie associate a virus erpetici, rispettivamente HHV6-8 e EBV, oltre al CCM associato a MCPyV. L'immunosoppressione può portare all'insorgenza di infezioni persistenti, anche in presenza di antigeni virali immunogenici [13]. Il CCM è infatti più frequente nei pazienti con leucemia o infezione da HIV e in quelli immunosoppressi, a seguito di un trapianto di organi o per altre cause. La mortalità è più elevata negli individui immunosoppressi che nei pazienti immunocompetenti. Questi risultati sottolineano il ruolo cruciale di una sorveglianza immunitaria efficiente nel controllo della crescita e della progressione tumorale.

Una delle cause dell'immunodepressione è il trattamento di malattie autoimmuni con farmaci biologici, in particolare con anticorpi monoclonali. Dal 2013 il mercato di tali farmaci mostra un incremento annuale compreso tra il 7.2% e il 18.3%, superando i 98 miliardi di dollari negli Stati Uniti d'America. L'aumento progressivo dell'utilizzo dei farmaci biologici ha generato un conseguente aumento di pazienti immunodepressi. Un ulteriore fattore rilevante per l'abbassamento delle difese immunitarie e quindi per la riattivazione di MCPyV, è riconducibile nei paesi industrializzati al progressivo aumento dell'età media della popolazione. Ad esempio, si stima che in Italia, la popolazione attuale di individui di 80 anni e oltre, che rappresentano ormai il 7% della popolazione totale, sia attualmente raddoppiata rispetto a quella di 25 anni fa, passando da 1 milione 955 mila a 4 milioni 207 mila persone.

Poiché i pazienti affetti da malattie autoimmuni sottoposti a terapia con farmaci monoclonali presentano un aumento dell'incidenza del CCM [8], è di primaria importanza la sorveglianza immunologica in pazienti affetti da malattie autoimmuni, quali artrite reumatoide, spondilite anchilosante e da sclerosi multipla trattati con anticorpi monoclonali. Inoltre, le patologie indotte da MCPyV, quali il carcinoma delle cellule di Merkel (CCM), presentano un decorso clinico lento nei pazienti affetti da malattie autoimmuni, in terapia con anticorpi monoclonali. Infatti, l'insorgenza del CCM avviene prevalentemente non prima di un anno dall'inizio del trattamento con gli anticorpi monoclonali. È quindi fondamentale una sorveglianza prolungata nel tempo dei livelli di anticorpi

contro MCPyV presenti nei sieri di questi pazienti, almeno ogni sei mesi, con l'obiettivo di garantire un esito positivo.

Considerato quanto detto in precedenza, vi è la necessità di sviluppare nuovi metodi di analisi/saggi immunologici che siano specifici, rapidi e a basso costo e che consentano di identificare in maniera selettiva e specifica anticorpi contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV, che sono considerate le proteine chiave dell'insorgenza del CCM. Ciò è particolarmente utile in alcune classi di individui sani e pazienti, tra cui: (i) soggetti sani che possono avere un rischio elevato d'insorgenza del CCM, quali soggetti anziani o donatori di sangue, di cellule staminali e di organi; (ii) pazienti affetti da diverse patologie oncologiche, compreso il cancro, incluso il CCM; (iii) pazienti immunocompromessi o immunosoppressi che hanno ricevuto un trapianto d'organo o malati di AIDS o altre patologie immunodepressive; (iv) pazienti affetti da diverse patologie, quali malattie autoimmuni, neurologiche e renali.

Metodi diagnostici per MCPyV attuali o alternativi

Diversi gruppi di ricerca, compresi gli inventori della presente invenzione, hanno sviluppato ed impiegato tecniche di biologia e genetica molecolare, tra le quali la reazione a catena della polimerasi "polymerase chain reaction" (PCR), sia qualitativa che quantitativa, per identificare la presenza di sequenze genomiche (DNA) di MCPyV, in svariate e diverse tipologie di campioni umani, tra cui siero, sangue, tessuti tumorali e linee cellulari [14,15].

Gli attuali approcci metodologici per rilevare la presenza di anticorpi sierici contro le proteine del virus MCPyV includono saggi di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) relativamente laboriosi, costosi e caratterizzati da una elevata durata procedurale. La maggior parte di questi metodi immunologici sono basati sull'uso, come antigeni virali, di "virus-like particles" (VLP), note per essere aggregati di proteine capsidiche ricombinanti di MCPyV che si auto-assemblano *in vitro* [7]. Tuttavia, l'uso delle VLP è una limitazione metodologica di questo tipo di saggi immunologici. Infatti, la sintesi delle VLP prevede un numero elevato di passaggi laboriosi: dalla produzione *in vitro* di batteri ricombinanti, all'isolamento, quantificazione ed infine l'uso delle VLP stesse nei saggi immunologici, che a loro volta prevedono diversi laboriosi passaggi. Inoltre, l'uso di VLP potrebbe anche incrementare la probabilità di possibili cross-reazioni tra diversi virus polioma (PyV), che possono pertanto portare all'ottenimento di risultati falsi. Infatti, è noto che i PyV presentano un certo grado di omologia di sequenza [16]. Altri studi riportano lo sviluppo di metodi ELISA basati sul rilevamento multiplo di anticorpi anti-virali denominato "Multiplex Serology", basato sull'impiego di microsfere fluorescenti, in combinazione con la glutatione S-transferasi (GST) [17]. Una delle maggiori limitazioni di tali approcci immunologici è che questi sistemi impiegano capsomeri virali

come antigeni per le immunoreazioni. Gli inventori hanno recentemente sviluppato e validato un test ELISA indiretto basato sull'uso di peptidi sintetici lineari che mimano porzioni immunogeniche delle proteine strutturali capsidiche di MCPyV VP1 e VP2 per il rilevamento di anticorpi umani sierici generati contro le VP1 e VP2 di MCPyV [2], descritto nella domanda di brevetto WO202253944.

5 Tuttavia, il metodo descritto in WO202253944 non consente di valutare la presenza di un possibile processo di trasformazione/tumorigenico in atto nel soggetto. Infatti, la ricerca di anticorpi generati contro le proteine capsidiche/strutturali di MCPyV VP1 e VP2 consente di valutare solamente la risposta immunitaria del soggetto in esame contro l'infezione/virioni di MCPyV.

10 WO200979481 descrive sequenze amminoacidiche che mimano le proteine capsidiche VP di MCPyV.

Attualmente in commercio non sono ancora disponibili metodi specifici per rilevare nell'uomo anticorpi sierici contro MCPyV. Tuttavia, tali metodi saranno sempre più richiesti a causa dell'aumento dei pazienti immunodepressi e/o di età avanzata e quindi delle patologie causate da MCPyV nella popolazione umana.

15 In particolare, non sono noti metodi che consentano di valutare la presenza di un processo tumorigenico in atto in un soggetto dovuto alla presenza di MCPyV.

Pertanto vi è ancora la necessità di un test/saggio immunologico per il rilevamento di anticorpi contro MCPyV, in particolare contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV, che sia standardizzato, specifico, sensibile, rapido, a basso costo e privo di reattività crociata.

20 **RIASSUNTO DELL'INVENZIONE**

Gli inventori forniscono una soluzione del problema tecnico sopra esposto fornendo un test immunologico, basato in particolare su ELISA indiretto, specifico e rapido, per rilevare la presenza di anticorpi IgG contro le proteine oncogene LT e sT del virus oncogeno poliovirus umano MCPyV, mediante l'uso di peptidi sintetici, anche denominati mimotopi. Vantaggiosamente, il metodo non
25 prevede l'uso di proteine ricombinanti come antigeni.

In particolare, la presente invenzione comprende l'identificazione di brevi sequenze peptidiche che rappresentano epitopi specifici e bersagli immunologici selettivi per gli anticorpi presenti nei sieri e altri fluidi umani contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV. Le proteine LT e sT di MCPyV si comportano come oncogeni attivati e sono responsabili dell'insorgenza del tumore della cute denominato carcinoma delle cellule di Merkel.
30

La presente invenzione riguarda anche un kit diagnostico per la rilevazione di anticorpi contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV nel siero e nei fluidi biologici umani.

Il metodo e il kit dell'invenzione sono particolarmente vantaggiosi per l'uso in pazienti immunodepressi ed individui a rischio come individui anziani. Questi soggetti sono infatti potenzialmente esposti alla riattivazione del virus MCPyV, ubiquitario nell'uomo, ma mantenuto sotto controllo in condizioni di latenza da un sistema immunitario sano. Nei pazienti affetti da malattie autoimmuni in terapia con anticorpi monoclonali è necessario il monitoraggio continuo degli anticorpi sierici contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV, tipicamente, almeno una volta ogni sei mesi. Pertanto il kit qui descritto può essere vantaggiosamente utilizzato periodicamente sugli stessi pazienti durante il trattamento con anticorpi monoclonali, che può durare anche diversi anni.

È quindi un primo aspetto della presente invenzione un peptide isolato corrispondente ad almeno un epitopo del virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV), in particolare corrispondente ad almeno un epitopo dell'antigene T grande (LT) e/o T piccolo (sT), che consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità di almeno il 95% con una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo che consiste di SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4 e SEQ ID NO. 5. Detto peptide isolato è caratteristico di MCPyV e specifico, nel senso che non reagisce in modo crociato con antigeni/epitopi di altri virus polioma.

Preferibilmente, detto peptide consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità del 100% con una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo che consiste di SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4 e SEQ ID NO. 5

Un secondo aspetto della presente invenzione è una composizione comprendente due o più peptidi aventi sequenza SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, o SEQ ID NO. 5. Detta composizione può contenere qualunque combinazione dei peptidi sopra indicati, può contenere ad esempio due, tre, quattro o cinque peptidi scelti fra i peptidi sopra indicati. In una realizzazione, detta composizione comprende almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 1, almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 2, almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 3, almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 4, e almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 5.

Un terzo aspetto della presente invenzione è un metodo *in vitro* per il rilevamento di anticorpi contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) in un campione isolato di un fluido biologico comprendente almeno le fasi di:

- (a) porre detto campione isolato di un fluido biologico a contatto con almeno un peptide isolato che consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità di almeno il 95% con una

sequenza amminoacidica scelta fra SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, e SEQ ID NO. 5; e

(b) rilevare la formazione di almeno un immunocomplesso fra almeno un anticorpo contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) e almeno un peptide del punto (a), qui denominato anche come antigene, in cui la formazione dell'immunocomplesso è indicativa della presenza di almeno un anticorpo contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) nel campione isolato.

In una realizzazione preferita detto campione isolato di un fluido biologico è posto a contatto con tutti i peptidi che consistono di una sequenza amminoacidica avente una identità di almeno il 95% con una sequenza amminoacidica di SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, e SEQ ID NO. 5.

Preferibilmente, detto fluido biologico è umano, cioè è stato precedentemente prelevato da un soggetto umano.

Un quarto aspetto della presente invenzione è un kit diagnostico per la determinazione di anticorpi contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV), in un campione isolato di un fluido biologico, preferibilmente umano, di un soggetto sospettato di essere infettato da MCPyV, il kit comprendente almeno: (I) almeno un peptide isolato che consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità di almeno il 95% con una sequenza amminoacidica scelta fra SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, e SEQ ID NO. 5; e (II) almeno un reagente per rilevare la formazione di un immunocomplesso fra almeno un anticorpo contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) e detto almeno un peptide in (I).

Secondo una forma di realizzazione preferita detto reagente in (II) comprende un anticorpo secondario anti-uomo.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Figure

Figura 1: Visualizzazione tridimensionale delle strutture delle proteine LT e sT e localizzazione dei peptidi. A) modello tridimensionale (3D) predetto dell'LT e localizzazione dei peptidi LT-1, LT-2 e LT-4. B) struttura 3D predetta della proteina sT e localizzazione dei peptidi sT-1 e sT-2.

Figura 2: Curve "Receiver Operating Characteristic (ROC)". Le curve ROC sono state computate sulla base dei valori di densità ottica (OD) ottenuti su sieri di controllo MCPyV-positivi (n=128) e MCPyV-negativi (n=137), sia per i peptidi MCPyV LT (A, B, C) che sT (D, E).

Definizioni

Nell'ambito della presente invenzione, per "peptide" si intende un composto organico risultante dall'unione di due o più molecole di amminoacidi (ad es. un dipeptide, un tripeptide, un polipeptide) riuniti attraverso legami peptidici (un legame amminoacidico che si forma tra il gruppo α -carbossilico di un amminoacido e il gruppo α -amminico di un altro amminoacido), con un peso molecolare inferiore ai 5.000 dalton.

Nell'ambito della presente invenzione, per "virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV)" si intende un piccolo virus oncogeno a DNA bicatenario, appartenente alla famiglia dei Poliomaviridae, che secondo le indicazioni della WHO/IARC presenta un'attività oncogena confermata nell'uomo, associata all'insorgenza e progressione del carcinoma delle cellule di Merkel (CCM).

Nell'ambito della presente invenzione, per "carcinoma delle cellule di Merkel" si intende un raro e altamente aggressivo tumore epiteliale di origine neuroendocrina.

Nell'ambito della presente invenzione, per "proteina oncogena virale" si intende una proteina codificata dai geni compresi nella regione precoce, che appartiene almeno ad un gruppo tra: antigeni T grande (large T, LT), T piccolo (small T, sT), 57kT, e la proteina "Alternative frame of the large T ORF" (ALTO). In particolare, le oncoproteine hanno un ruolo chiave nella replicazione e trascrizione del genoma virale (ad es. le proteine oncogene LT ed sT di MCPyV).

Nell'ambito della presente invenzione, per "paziente immunosoppresso" si intende un paziente sottoposto ad un trattamento medico-farmacologico che prevede l'assunzione da parte del paziente di almeno un farmaco immunosoppressivo (per es. un farmaco biologico, in particolare un anticorpo monoclonale), capace di inibire la risposta del sistema immunitario ad antigeni estranei all'organismo oppure un soggetto che ha ricevuto un trapianto d'organo o un soggetto malato di patologie immunodepressive, ad es. quelle a eziologia autoimmunitaria (ad es. artrite reumatoide, spondilite anchilosante, sclerosi multipla), malattie neoplastiche, AIDS. Paziente immunocompromesso è un sinonimo.

Nell'ambito della presente invenzione, per "biomarcatore" si intende un indicatore biologico o biochimico che può essere messo in relazione con l'insorgenza o lo sviluppo di una patologia, come la presenza di un agente infettivo o l'esistenza di cancro. "Predittore di rischio" è un sinonimo.

In una forma di realizzazione, un campione isolato di fluido biologico viene considerato positivo agli anticorpi contro la proteina LT di MCPyV se viene rivelata la formazione di un immunocomplesso fra un anticorpo e almeno due peptidi (antigeni) scelti fra SEQ ID NO. 1 (LT-1), SEQ ID NO. 2 (LT-2) e SEQ ID NO. 3 (LT-4).

In una forma di realizzazione, un campione isolato di fluido biologico viene considerato positivo agli anticorpi contro la proteina sT di MCPyV se viene rivelata la formazione di un immunocomplesso fra un anticorpo e entrambi i peptidi (antigeni) con SEQ ID NO. 4 (sT-1), e SEQ ID NO. 5 (sT-3).

In una forma di realizzazione preferita, suddetti anticorpi contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV possibilmente presenti nel campione di fluido biologico sono anticorpi IgG umani.

Secondo un'altra forma di realizzazione preferita, la rilevazione di un immunocomplesso avviene tramite utilizzo di un anticorpo secondario anti-uomo. Qualunque anticorpo secondario anti-uomo di comune utilizzo nel settore può essere usato, ad esempio un anticorpo di capra.

In un'ulteriore forma di realizzazione preferita, detto fluido biologico è umano e viene scelto da un gruppo comprendente siero, plasma, sangue, saliva, urina o liquido cerebrospinale. Tra questi, il siero è il più preferito.

In un'ulteriore forma di realizzazione preferita, la formazione di un immunocomplesso viene rilevata mediante un immunosaggio, preferibilmente scelto fra immunoprecipitazione, immunodosaggio, preferibilmente ELISA o RIA o saggio immunologico a fluorescenza, western blot, analisi FACS o una tecnica immunocitochimica/immunoistochimica. Tra questi, il saggio ELISA indiretto è il più preferito.

In un'ulteriore forma di realizzazione preferita il campione isolato di fluido biologico è stato isolato da un soggetto scelto fra:

(i) un paziente affetto da una o più patologie oncologiche, comprendente il cancro. Il cancro è preferibilmente carcinoma delle cellule di Merkel (CCM);

(ii) un paziente immunocompromesso o immunosoppresso, ad esempio un soggetto che ha ricevuto un trapianto d'organo o malato di AIDS o altre patologie immunodepressive,

(iii) un paziente affetto da una o più patologie, comprendenti malattie autoimmuni, malattie neurologiche e malattie renali;

(iv) un individuo sano con o senza un rischio elevato d'insorgenza del carcinoma delle cellule di Merkel (CCM), come ad esempio un soggetto anziano o un donatore di sangue, di cellule staminali e/o di organi. Per soggetto anziano si intende un soggetto avente più di 65 anni.

Preferibilmente, detto soggetto ha un rischio medio o elevato d'insorgenza del carcinoma delle cellule di Merkel (CCM).

In una realizzazione preferita, il soggetto è affetto da una malattia autoimmune scelta fra artrite reumatoide, spondilite anchilosante e sclerosi multipla e può essere in terapia con uno o più anticorpi monoclonali.

5 In un'altra forma di realizzazione preferita il kit diagnostico comprende una piastra ELISA come supporto solido di saggio.

In un'ulteriore forma di realizzazione preferita il kit diagnostico viene utilizzato nel rilevamento della presenza di anticorpi contro MCPyV in un fluido biologico umano.

Il kit diagnostico della presente invenzione può essere vantaggiosamente utilizzato nell'automazione del processamento di analisi dei campioni nei laboratori ospedalieri di analisi cliniche.

10 I peptidi dell'invenzione possono anche essere usati come predittori di rischio, e/o biomarcatori dell'insorgenza del cancro delle cellule di Merkel (CCM) associato al virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV). Infatti, la presenza nel siero o in altri fluidi biologici umani di anticorpi contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV è indicativa di un rischio più alto di sviluppare un cancro, come ad es. CCM.

15 È quindi anche un oggetto dell'invenzione l'uso di almeno un peptide isolato che consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità di almeno il 95%, preferibilmente del 100%, con una sequenza amminoacidica scelta fra SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, e SEQ ID NO. 5 come biomarcatore per predire l'insorgenza del cancro delle cellule di Merkel (CCM) associato al virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV).

20 E' un ulteriore oggetto dell'invenzione un metodo di screening di un soggetto, preferibilmente un soggetto a rischio di sviluppare un cancro, per predire l'insorgenza del cancro delle cellule di Merkel (CCM) comprendente almeno un passaggio a) di porre un campione di un fluido biologico isolato da detto soggetto a contatto con almeno un peptide isolato che consiste di una sequenza amminoacidica
25 avente una identità di almeno il 95% con una sequenza amminoacidica scelta fra SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, e SEQ ID NO. 5. Detto metodo comprende preferibilmente un ulteriore passaggio b) di rilevazione di un immunocomplesso fra almeno un anticorpo contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) e almeno un peptide del punto (a), dove la rilevazione di detto immunocomplesso è indicativa della possibile insorgenza del cancro delle cellule di Merkel (CCM) in detto soggetto.

30 I peptidi dell'invenzione possono essere ottenuti mediante le comuni metodiche di sintesi di peptidi note nel settore. In una forma di realizzazione un peptide sintetico può essere ottenuto per mezzo di processi di sintesi.

In una realizzazione esemplificativa della presente invenzione, la rilevazione di anticorpi contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV in un campione isolato di siero umano avviene mediante un saggio immunologico ELISA indiretto, che comprende le seguenti fasi:

- 1) Una fase di preparazione di almeno un peptide e coating;
- 2) Una fase di blocking;
- 3) Una fase di aggiunta di anticorpi primari;
- 4) Una fase di aggiunta di anticorpo secondario;
- 5) Una fase di rilevazione e lettura allo spettrofotometro; e
- 6) Una fase di calcolo del valore soglia (cut off).

Tutti detti passaggi possono essere eseguiti secondo le comuni conoscenze nel settore. Si può fare ad esempio riferimento ai lavori [2-4].

Ad esempio, nella fase (1) almeno un peptide liofilizzato scelto fra LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3 viene disciolto e successivamente viene fatto aderire (coating) in un corrispondente pozzetto di una piastra da 96 pozzetti. Dopo un periodo di incubazione i peptidi in eccesso che non hanno aderito alle pareti dei pozzetti vengono rimossi.

Ad esempio, nella fase (2) ad ogni pozzetto della piastra da 96 pozzetti viene aggiunto un reagente "Blocking Solution" in modo di evitare che un anticorpo primario eventualmente presente nei campioni di siero interagisca con la superficie del pozzetto. "Blocking solution" sono note nel settore.

Ad esempio, nella fase (3) ad ogni pozzetto contenente uno specifico peptide viene aggiunto un campione di siero da analizzare, in modo da evidenziare l'eventuale presenza di anticorpi circolanti contro le proteine oncogene LT ed sT di MCPyV. Viene incluso anche almeno un controllo positivo, e almeno un controllo negativo costituiti da sieri appartenenti a pazienti affetti da carcinoma delle cellule di Merkel (CCM), risultati rispettivamente in precedenza: (i) positivi agli anticorpi IgG contro le proteine oncogene LT/sT di MCPyV; (ii) negativi agli anticorpi IgG contro le proteine oncogene LT/sT di MCPyV. Ciascun campione di siero può essere testato in doppio ed in tre replicati sperimentali.

Ad esempio, nella fase (4) dopo aver rimosso l'anticorpo primario in eccesso, in ogni pozzetto viene aggiunto un anticorpo secondario, ad esempio un anticorpo di capra anti-uomo coniugato con perossidasi.

Ad esempio, nella fase (5) dopo aver rimosso l'anticorpo secondario in eccesso, in ciascun pozzetto viene aggiunto un reagente che permette la lettura allo spettrofotometro, ad esempio 2,2'-Azino-bis-

3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, (ABTS), per quantificare il livello di anticorpi eventualmente presenti nei campioni di siero. I valori di densità ottica (OD) ottenuti dopo la lettura vengono poi analizzati.

Ad esempio, nella fase (6) il valore soglia (cut off) viene calcolato attraverso la media dei valori delle OD di tre campioni di controllo negativi, a cui viene sommata la deviazione standard addizionata tre volte. Ad esempio, un campione di siero viene considerato positivo agli anticorpi contro la proteina LT di MCPyV se contemporaneamente positivo ad almeno due peptidi LT-1, LT-2 e LT-4 su tre, cioè quando i valori delle OD sono superiori ai valori di cut-off dei singoli esperimenti. Similmente, un campione di siero viene considerato positivo agli anticorpi contro la proteina sT di MCPyV se contemporaneamente positivo ai peptidi sT-1 e sT-3.

L'invenzione verrà ora illustrata con l'ausilio di esempi.

ESEMPI

MATERIALI E METODI

Campioni biologici

Per lo studio sono stati raccolti i seguenti campioni di siero appartenenti a pazienti affetti da carcinoma delle cellule di Merkel (CCM), risultati in precedenza (i) positivi agli anticorpi IgG contro le proteine oncogene LT/sT di MCPyV (n=128, età media \pm deviazione standard [DS], $75 \pm [9]$ anni); (ii) negativi agli anticorpi IgG contro le proteine oncogene LT/sT di MCPyV (n=137, età media \pm [DS], $60 \pm [8]$ anni) con un test immunologico considerato come gold standard [1]. I sieri sono stati forniti da Cliniche Universitarie e Centri di Ricerca, dopo aver firmato il consenso informato in conformità con la Dichiarazione di Helsinki. E' stato raccolto l'espresso consenso, libero e informato, a tale prelievo e utilizzazione della persona da cui è stato prelevato tale materiale, in base alla normativa vigente.

Le proteine oncogene dei virus polioma, verso le quali vengono prodotti gli anticorpi, sono codificate dalla regione denominata precoce del genoma virale. I peptidi lineari qui riportati sono stati sintetizzati utilizzando tecniche e apparecchiature standard [2-4]. La serie di peptidi utilizzati come antigeni specifici del virus MCPyV, nel saggio ELISA indiretto per rilevare nei sieri gli anticorpi contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV, sono:

Peptide LT-1, 21 amminoacidi, con la seguente sequenza (da N-terminale NH₂ a C-terminale COOH):

KFKEWWRSGGFSFGKAYEYGP (SEQ ID NO. 1)

Peptide LT-2, 21 amminoacidi, con la seguente sequenza:

ASRGAPSGSSPPHSQSSSSGY (SEQ ID NO. 2)

Peptide LT-4, 20 amminoacidi, con la seguente sequenza:

GTWEDLFCDESLSSPEPPSS (SEQ ID NO. 3)

Peptide sT-1, 19 amminoacidi, con la seguente sequenza:

5 QSGYNARFCRGP GCMLKQL (SEQ ID NO. 4)

Peptide sT-3, 19 amminoacidi, con la seguente sequenza:

SKCACISCKLSRQHCSLKT (SEQ ID NO. 5)

Questi peptidi LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3 sono derivati dalle sequenze amminoacidiche delle proteine oncogene LT e sT di MCPyV.

10 **Identificazione di anticorpi contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV nei sieri umani mediante il saggio immunologico ELISA indiretto**

Il test è suddiviso in diverse fasi come precedentemente riportato [2–4]:

1. Fase di preparazione dei peptidi e coating. Durante questa prima fase i peptidi liofilizzati LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3 vengono disciolti in Coating Buffer 1X (Candor Bioscienze GmbH – CABRU s.a.s. Milano) per avere una concentrazione finale di 100 µg/mL. Vengono poi eseguite delle aliquote dei peptidi disciolti, le quali vengono conservate a - 20°C. I peptidi sintetici vengono quindi successivamente fatti aderire (coating) ai pozzetti di una piastra da 96 pozzetti. Un volume di 100 µL di ciascun peptide, diluito 1:2 in Coating Buffer 1X, in modo da ottenere una concentrazione finale di 50 µg/mL, viene aggiunto tramite pipetta multicanale in ogni pozzetto della piastra da 96 pozzetti. Ciascun specifico peptide viene inserito in un corrispondente pozzetto. Per permettere ai peptidi di aderire alle pareti dei pozzetti, la piastra viene incubata al buio a 4°C per 16-18 ore. Alla fine del periodo di incubazione, si effettuano tre lavaggi con 250 µL di Washing Buffer 10X (Candor Bioscience GmbH - CABRU s.a.s. Milano) per ogni pozzetto, precedentemente diluito 0.5X con acqua bidistillata. Questa fase viene effettuata allo scopo di rimuovere i peptidi in eccesso che non hanno aderito alle pareti dei pozzetti. I lavaggi vengono realizzati utilizzando uno strumento denominato washer (Thermo Electron Corporation, Wellwash 4 MK 2, Pobbiano, Italia).
2. Fase di blocking. In questa seconda fase, tramite pipetta multicanale vengono aggiunti 200 µl di Blocking Solution (Candor Bioscience GmbH – CABRU s.a.s. Milano) ad ogni pozzetto della piastra da 96 pozzetti così da evitare che rimangano aree del pozzetto non coperte dal peptide. In questo modo si ottiene la saturazione dei pozzetti e si evita che l'anticorpo primario eventualmente presente nei campioni di siero interagisca con la superficie del pozzetto. Dopo l'aggiunta della Blocking

Solution, la piastra viene fatta incubare al buio a 37°C per 90 minuti. Come ultima fase, vengono effettuati tre lavaggi con Washing Buffer (250 uL per ogni pozzetto), diluito 0.5X, utilizzando lo strumento washer.

3. Aggiunta degli anticorpi primari. A questo punto è possibile aggiungere ai rispettivi pozzetti i
5 campioni di siero da analizzare, in modo da evidenziare l'eventuale presenza di anticorpi circolanti contro le proteine oncogene LT ed sT di MCPyV. Per ogni esperimento vengono testati anche dei campioni di controllo costituiti da sieri appartenenti a pazienti affetti da carcinoma delle cellule di Merkel (CCM), risultati in precedenza (i) positivi agli anticorpi IgG contro le proteine oncogene LT/sT di MCPyV; (ii) negativi agli anticorpi IgG contro le proteine oncogene LT/sT di MCPyV. In
10 ogni pozzetto vengono quindi aggiunti 100 µL di siero, precedentemente diluiti 1:20 in Low Cross Buffer (Candor Bioscience GmbH - CABRU s.a.s. Milano, Italia); ogni campione di siero viene testato in doppio ed in tre replicati sperimentali da operatori differenti. Dopo l'aggiunta dei campioni di siero, la piastra viene incubata al buio a 37°C per 90 minuti.
4. Aggiunta dell'anticorpo secondario. Per rimuovere il siero in eccesso in ogni pozzetto, vengono
15 effettuati tre lavaggi con 250 µL di washing buffer diluito 0.5X. Utilizzando una pipetta multicanale, in ogni pozzetto vengono successivamente aggiunti 100 µL di anticorpo secondario di capra anti-uomo coniugato con perossidasi (CalbioChem, Milano), precedentemente diluito 1:10.000 in Low Cross Buffer. La piastra viene poi fatta incubare al buio a temperatura ambiente per 90 minuti.
5. Rilevazione e lettura allo spettrofotometro. Allo scopo di rimuovere l'anticorpo secondario in
20 eccesso, si effettuano tre lavaggi con 250 µL di Washing Buffer diluito 0.5X per ogni pozzetto. Utilizzando una pipetta multicanale, vengono aggiunti in ogni pozzetto 100 µL di 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS; Sigma, Milano). La piastra viene lasciata incubare al buio a temperatura ambiente per 45 minuti. L'aggiunta del reagente ABTS permetterà la lettura allo spettrofotometro (Thermo Electron Corporation, Wellwash 4 MK 2. Pobbiano, Italia) ad una
25 lunghezza d'onda di 405 nm, con lo scopo di quantificare il livello di anticorpi eventualmente presenti nei campioni di siero. I valori di densità ottica (OD) ottenuti dopo la lettura vengono poi analizzati: i valori dei duplicati nella stessa piastra, così come i replicati sperimentali, devono essere paragonabili tra loro.
6. Calcolo del valore soglia (cut off). Il valore soglia (cut off) viene calcolato per ogni esperimento e a
30 seconda del peptide utilizzato. In particolare, il valore cut off viene calcolato attraverso la media dei valori delle OD di tre campioni di controllo negativi, a cui viene sommata la deviazione standard addizionata tre volte. Un campione di siero viene considerato positivo agli anticorpi contro la proteina LT di MCPyV se contemporaneamente positivo ad almeno due peptidi LT-1, LT-2 e LT-4 su tre, cioè

quando i valori delle OD sono superiori ai valori di cut-off dei singoli esperimenti. Similmente, un campione di siero viene considerato positivo agli anticorpi contro la proteina sT di MCPyV se contemporaneamente positivo ai peptidi sT-1 e sT-3. Questa procedura di calcolo è in linea con esperimenti effettuati in precedenza e anche con la letteratura internazionale che riguarda l'argomento [3–6].

RISULTATI

Esempio 1

Analisi Computazionali

Analisi di sequenza

Nel presente studio è stato sviluppato e validato un nuovo metodo immunologico per determinare la presenza di anticorpi sierici contro gli antigeni LT e sT di MCPyV. Il saggio è basato sull'impiego di brevi sequenze lineari peptidiche sintetiche uniche di MCPyV, definite mimotopi, che rappresentano antigeni/epitopi specifici e bersagli immunologici per gli anticorpi sierici umani. Ad oggi, non sono disponibili metodi rapidi e specifici, che utilizzino tecniche immunologiche per verificare inequivocabilmente la presenza di anticorpi contro gli antigeni LT e sT di MCPyV nell'uomo.

In particolare, cinque nuovi peptidi sintetici lineari, denominati LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3, che mimano rispettivamente gli epitopi delle proteine oncogene LT e sT di MCPyV, sono stati disegnati e impiegati nei test immunologici come mimotopi per rilevare gli anticorpi IgG anti-MCPyV.

In una prima fase, è stata valutata l'identità tra i residui amminoacidici (a.a.) dei cinque peptidi in oggetto e le corrispondenti sequenze delle proteine LT e sT dei ceppi nativi dei poliomavirus (PyV) isolati dai 16 PyV umani/di scimmie noti, compreso MCPyV e le sue centinaia di sequenze di LT (n=229) e sT (n=70) note. Le analisi computazionali sono state eseguite tramite il software DNASTAR (Lasergene, Madison, Stati Uniti) [2]. Le sequenze a.a. dei peptidi LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3 sono risultate essere altamente concordanti con le sequenze amminoacidiche delle proteine LT ed sT di MCPyV. In particolare, la sequenza a.a. del peptide LT-1 è risultata essere identica al 100% a quella corrispondente della proteina LT dei 229 ceppi isolati di MCPyV, inclusi i ceppi nordamericani (MCC350 o EU375803.1 e MCC339 o EU375804.1), giapponesi (TKS e FJ464337), europei (MKL-1 o FJ173815) e cinesi (HB039C o KC571692.1). Inoltre, la sequenza a.a. del peptide LT-2 era identica al 100% a quella della corrispondente LT di 226 ceppi isolati di MCPyV, inclusi i ceppi principali di MCPyV sopra menzionati, pur essendo concordante al 95.2% (20/21 a.a.) con quella di seguenti ceppi di MCPyV isolati A0A0D3LRX9, X5FLV8 e E2GHQ3. Inoltre, la sequenza a.a. del peptide LT-4 era concordante al 100% con la sequenza corrispondente della proteina LT di

227 ceppi isolati di MCPyV, inclusi i ceppi principali di MCPyV sopra menzionati, e al 95% (19/20 a.a.) concordante con quella dei ceppi di MCPyV A0A0D3LRZ4 e G8FSZ3. Per quanto riguarda sT-1 e sT-3, le loro sequenze a.a. erano identiche al 100% a quella degli sT di tutti i 70 ceppi MCPyV attualmente noti. In pochi casi, per tutti i peptidi LT/sT, l'identità con i ceppi nativi LT e sT degli altri 15 PyV era compresa tra il 55% ed il 32%, pur essendo inferiore al 32% nella maggior parte dei casi. Inoltre, i peptidi LT e sT differiscono anche dai ceppi nativi LT e sT dei 15 diversi PyV, a causa della presenza sporadica (o assenza) di a.a. all'interno della loro sequenza amminoacidica.

Analisi conformazionali tridimensionali

Sono state eseguite ulteriori analisi computazionali per valutare la posizione e struttura secondaria dei peptidi nel contesto delle proteine LT e sT. Le analisi computazionali sono state eseguite tramite il software DNASTAR (Lasergene, Madison, Stati Uniti) [2]. I peptidi LT-1, LT-2 e LT-4 corrispondono agli a.a. 89-109, a.a. 125-145 e a.a. 207-226, rispettivamente, del ceppo di riferimento MCPyV LT B6DVW7_9POLY LT. I peptidi sT-1 e sT-3 sono localizzati negli a.a. 96-114 e 117-135 del ceppo di riferimento MCPyV sT B0G0V7_9POLY. Le strutture terziarie delle proteine LT e sT di MCPyV sono state predette in modo computazionale utilizzando il software DNASTAR. Le sequenze a.a. dei peptidi LT-1, LT-2, LT-4 e sT-1, sT-3 sono caratterizzate dalla formazione di strutture secondarie stabili. Infatti, tutti i peptidi LT e sT mostrano diversi domini random coil. Inoltre, il peptide sT-3 forma una struttura secondaria stabile dall' a.a. 122 all'a.a. 135, cioè 122ISCKLSRQHCSLKT135, dove si trova un dominio ad alfa elica, circondato da due strutture secondarie a random coil (**Fig. 1**). La rappresentazione grafica tridimensionale dei peptidi LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3 mappati rispettivamente sulle strutture native predette di LT e sT di MCPyV, indicava che queste regioni sono esposte esternamente sulle superfici proteiche, o comunque in regioni potenzialmente accessibili agli anticorpi e conseguentemente potenzialmente immunogeniche (epitopi) (**Fig. 1**).

Studio dei siti immunogenici

Per valutare se i peptidi selezionati possono rappresentare siti immunogenici naturali, abbiamo predetto gli epitopi CTL HLA-A1, HLA-A2, HLA-A*0201 e HLA-A*0205 derivati dagli antigeni LT e sT utilizzando due specifici software denominati ProPred-I e NetCTL-1.2 [18, 19]. La sequenza a.a. della proteina MCPyV LT ottenuta dal database UniProt (numero di accesso: B6DVW7_9POLY) lunga 817 a.a., è stata scaricata in formato FASTA per eseguire le analisi computazionali descritte in seguito. Tutti i peptidi LT, cioè LT-1, LT-2, LT-4, sono risultati avere siti di legame putativi per gli MHC di classe I con entrambi i software. Nello specifico, le regioni corrispondenti agli a.a. 95-107, 137-145 e 207-212 di LT, in cui sono localizzati rispettivamente i peptidi LT-1, LT-2 e LT-3, sono

risultati essere siti immunogenici (epitopi) per gli HLA-A1 sia per ProPred-I che per NetCTL-1.2. Inoltre, il software Net-CTL-1.2. ha indicato come epitopo la sequenza corrispondente agli a.a. 140-145 di LT, in cui si trova il peptide LT-2. La sequenza a.a. della proteina MCPyV sT ricavata da UniProt (numero di accesso: B0G0V7_9POLY), lunga 186 a.a., è stata scaricata ed analizzata per valutare la presenza di eventuali epitopi. Le analisi effettuate utilizzando i due strumenti informatici ProPred-I e NeTCTL-1.2., hanno determinato la stessa sequenza immunogenica per gli HLA-A1 corrispondente agli a.a. 96-99 della proteina sT, in cui si trova il peptide sT-1. Per il peptide sT-3, il software ProPred-I ha rilevato la presenza di siti immunogenici. In particolare, i siti corrispondenti agli a.a. 117-120 e 125-135 della proteina sT, sono risultati epitopi per gli HLA-A2, HLA-A*0201 e HLA-A*0205. Questi risultati computazionali hanno suggerito che le sequenze a.a. selezionate per i peptidi LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3 possono quindi rappresentare brevi siti naturali di legame per gli anticorpi IgG, e probabilmente anche per altre classi di Ig, contro antigeni sia lineari che conformazionali.

Esempio 2

15 Valutazione dei parametri di prestazione dei peptidi nel rilevamento degli anticorpi IgG sierici contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV

Nel saggio ELISA indiretto sono stati esaminati complessivamente n=265 campioni di siero. In particolare, sono stati raccolti campioni di siero appartenenti a pazienti affetti da carcinoma delle cellule di Merkel (CCM), risultati in precedenza (i) positivi agli anticorpi IgG contro le proteine oncogene LT/sT di MCPyV (n=128, età media \pm deviazione standard [DS], $75 \pm [9]$ anni); (ii) negativi agli anticorpi IgG contro le proteine oncogene LT/sT di MCPyV (n=137, età media \pm [DS], $60 \pm [8]$ anni). I criteri valutati per ciascun peptide, calcolati confrontando i risultati attesi e ottenuti, sono mostrati nelle Tabelle 1 e 2. Secondo una procedura standard precedentemente riportata [2], per il computo dei criteri sono state considerate le seguenti condizioni dei campioni: veri positivi (TP, il numero di campioni positivi secondo le analisi precedenti), falsi positivi (FP, il numero di campioni positivi con il nostro test e negativi con le analisi precedenti), veri negativi (TN, il numero di campioni negativi secondo le analisi precedenti) e falsi negativi (FN, il numero di campioni negativi con il nostro test e positivi con le analisi precedenti). Le prestazioni del test sono state quindi valutate calcolando i seguenti criteri: sensibilità [Se, $TP/(TP+FN)$], specificità [Sp, $TN/(TN+FP)$], precisione [$(TP+TN)/(TP+TN+FP+FN)$], valore predittivo positivo [VPP, $TP/(TP+FP)$], valore predittivo negativo [VPN, $TN/(TN+FN)$], validità [come $(Se+Sp)/2$], accuratezza [$Se*Prevalenza+Sp*(1-Prevalenza)$]. L'accuratezza dei peptidi è stata valutata considerando le seguenti misure combinate: indice di Youden (J, $Se+Sp-1$), rapporto di verosimiglianza positivo [LR+, come $Se/(1-Sp)$], rapporto

di verosimiglianza negativo [LR-, (1 -Se)/Sp] [2]. Inoltre, il coefficiente kappa di Cohen (κ) è stato calcolato per valutare la concordanza tra i risultati attesi e quelli ottenuti. Il valore κ è stato interpretato come scarso ($\kappa \leq 0$), lieve ($0 < \kappa \leq 0,20$), discreto ($0,21 < \kappa \leq 0,40$), moderato ($0,41 < \kappa \leq 0,60$), sostanziale ($0,61 < \kappa \leq 0,80$) e quasi-perfetto ($0,81 < \kappa \leq 1,0$) [2].

- 5 **Tabella 1.** Parametri delle prestazioni del saggio immunologico per il rilevamento delle IgG contro la proteina oncogena LT del virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV).

	LT-1	LT-2	LT-4
Sensibilità (Se)	81.30% (73.4-87.6)	73.44% (64.9-80.9)	82.81% (75.1-88.9)
Specificità (Sp)	73.72% (65.5-80.8)	73.00% (75.0-80.2)	67.15% (62.0-74.9)
Precisione	77.35% (71.8-82.3)	73.21% (67.5-78.4)	74.72 % (69.0-79.8)
Rapporto di verosimiglianza (LR+)	3.09 (2.31-4.14)	2.72 (2.03-3.65)	2.52 (1.96-3.24)
Rapporto di verosimiglianza (LR-)	0.25 (0.18-0.37)	0.36 (0.27-0.49)	0.26 (0.17-0.38)
Valore predittivo positivo (VPP)	74.30% (68.3-79.5)	71.80% (65.4-77.3)	70.20% (64.7-75.2)
Valore predittivo negative (VPN)	80.80% (74.3-86.0)	74.63% (68.4-80.0)	80.70% (73.8-86.2)
Validità	77.50%	73.22%	75.00%
Indice di Youden (J)	0.55	0.46	0.50
Accuratezza	77.36%	73.20%	74.71%
Valore Kappa di Cohen (κ)	0.548	0.463	0.496

- 10 Criteri di prestazione diagnostica del saggio immunologico ottenuti testando sieri di controllo MCPyV-positivi (n=128) e - negativi (n=137). I numeri racchiusi tra parentesi per i parametri di sensibilità, specificità, accuratezza, LR+, LR-, PPV e NPV rappresentano l'intervallo di confidenza (CI) al 95%.

- 15 **Tabella 2.** Parametri delle prestazioni del saggio immunologico per il rilevamento delle IgG contro la proteina oncogena sT del virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV).

	sT-1	sT-3
Sensibilità (Se)	80.50% (72.5-86.9)	72.00% (63.3-79.7)
Specificità (Sp)	74.80% (66.3-82.0)	60.50% (51.1-69.3)
Precisione	77.65% (72,0-82.6)	66.40% (60.1-72.3)
Rapporto di verosimiglianza (LR+)	3.19 (2.34-4.36)	1.82 (1.42-2.34)
Rapporto di verosimiglianza (LR-)	0.26 (0.18-0.38)	0.46 (0.34-0.64)
Valore predittivo positivo (VPP)	76.30% (70.2-81.5)	65.70% (59.9-71.0)
Valore predittivo negativo (VPN)	79.17% (72.5-84.6)	67.30% (60.0-73.8)
Validità	77.64%	66.25%
Indice di Youden (J)	0.55	0.33
Accuratezza	77.70%	66.39%
Valore Kappa di Cohen (κ)	0.552	0.325

5 Criteri di prestazione diagnostica del saggio immunologico ottenuti testando sieri di controllo MCPyV-positivi (n=128) e -negativi (n=137). I numeri racchiusi tra parentesi per i parametri di sensibilità, specificità, accuratezza, LR+, LR-, PPV e NPV rappresentano l'intervallo di confidenza (CI) al 95%.

10 Il saggio immunologico ha dimostrato rispettivamente 81.3%, 73.44%, 82.81%, 80.5% e 72% di sensibilità per i peptidi LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3, i quali hanno inoltre dimostrato una specificità rispettivamente del 73.72%, 73%, 67.15%, 74.8% e 60.5%. Valori predittivi positivi (VPP) del 74.3%, 71.8%, 70.2%, 76.3% e 65.7% insieme a valori predittivi negativi (VPN) del 80.80%, 74.63%, 80.70%, 79.17% e 67.30%, sono stati rispettivamente calcolati per LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3. Allo stesso modo, i criteri di validità per LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3, sono risultati rispettivamente essere del 77.50%, 73.22%, 75.00%, 77.64% e 66.25%. È stata inoltre calcolata l'accuratezza dei peptidi LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3, risultando essere rispettivamente del 77.35%, 73.21%, 74.72%, 77.65% e 66.40%.

15

I valori ottenuti dei criteri sopramenzionati indicano che il saggio immunologico qui descritto è valido e accurato.

La valutazione dei parametri diagnostici ha anche indicato che l'indice di Youden (J), il rapporto di verosimiglianza positivo (LR+) e il rapporto di verosimiglianza negativo (LR-) erano rispettivamente 0.55, 3.09 e 0.25 per il peptide LT-1. Allo stesso modo, J, LR+ e LR- sono stati calcolati per LT-2 risultando rispettivamente 0.46, 2.72 e 0.36, mentre LT-3 ha riportato rispettivamente i valori 0.5, 2.52, 0.26 per gli stessi parametri. Similmente, i valori J, LR+ e LR- per sT-1 sono risultati rispettivamente 0.55, 3.19 e 0.26, mentre il peptide sT-3 ha mostrato 0.33, 1.82 e 0.46.

In sintesi, sono stati determinati valori di J, LR+ e LR- sufficienti per tutti i peptidi LT/sT.

In particolare, un valore J verso 1 esclude l'esistenza di falsi positivi/negativi, mentre maggiore (o minore) è il LR di un test positivo (o negativo), più attendibile è il risultato del saggio in fase di sviluppo. La concordanza tra i risultati attesi e quelli ottenuti è stata del 77.36%, con un valore Kappa di Cohen (κ) di 0.548 per LT-1, 73.20%, con un κ di 0.463 per LT-2 e, 74.71%, con un κ di 0.496 per LT-4. Similmente, l'sT-1 e l'sT-3 hanno mostrato rispettivamente una concordanza del 77.70% e del 66.39%, con un κ di 0.552 e 0.325.

La concordanza tra i risultati attesi/ottenuti si è rivelata essere inserita all'interno di un range di concordanza discreto/moderato. Questi valori indicano quindi una correlazione rilevante tra i risultati attesi e quelli ottenuti, sottolineando così che il nostro test raggiunge i prerequisiti sufficienti per il rilevamento degli anticorpi antivirali.

Successivamente, sono state computate le curve "receiver operating characteristic" (ROC) utilizzando le densità ottiche (OD) ottenute su sieri di controllo positivi e negativi per MCPyV, per i peptidi LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3. L'area sotto la curva (AUC) è risultata pari a 0.7 (95% CI: da 0.641 a 0.754), 0.597 (95% CI: da 0.535 a 0.656), 0.607 (95% CI: da 0.545 a 0.666), 0.631 (95% CI: da 0.569 a 0.690) e 0.509 (95% CI: da 0.444 a 0.573), rispettivamente per i peptidi LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3 (**Fig. 2**).

La differenza tra le AUC per i peptidi LT-1, LT-2, LT-4 e sT-1 è risultata essere statisticamente significativa rispetto a quella di un test senza valore (AUC=0.5, $p<0,01$) (**Fig. 2 A-D**). Le AUC dei peptidi LT-1, LT-2, LT-4 e sT-1 erano tutte comprese nell'intervallo di riferimento 0.6-0.7. L'AUC di sT-3, invece, è risultata essere simile a quella di un test senza valore (0.5, $p=0.8$) (**Fig. 2E**). Questi dati indicano che il dosaggio immunologico basato sui peptidi LT-1, LT-2, LT-4 e sT-1 è in grado di distinguere con molta efficienza sieri positivi e negativi.

I dati immunologici indicano che è stato messo a punto un test immunologico indiretto affidabile per la rilevazione di IgG sieriche contro le proteine oncogene LT ed sT di MCPyV nei sieri di controllo. Le analisi computazionali hanno indicato che i peptidi possono riconoscere in modo specifico le IgG generate contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV. Inoltre, i criteri di prestazione del test, tra cui sensibilità, accuratezza, specificità, affidabilità oltre che altri criteri, sono stati accuratamente valutati nei sieri di controllo MCPyV-positivi/-negativi e sono risultati essere adeguati.

BIBLIOGRAFIA

1. Rotondo, J.C.; Bononi, I.; Puozzo, A.; Govoni, M.; Foschi, V.; Lanza, G.; Gafa, R.; Gaboriaud, P.; Touzé, F.A.; Selvatici, R.; et al. Merkel cell carcinomas arising in autoimmune disease affected patients treated with biologic drugs including anti-TNF. *Clin. Cancer Res.* 2017, 23, 3929–3934.
2. Mazziotta, C.; Lanzillotti, C.; Torreggiani, E.; Oton-Gonzalez, L.; Iaquina, M.R.; Mazzoni, E.; Gaboriaud, P.; Touzé, A.; Silvagni, E.; Govoni, M.; et al. Serum antibodies against the oncogenic Merkel Cell Polyomavirus detected by an innovative immunological assay with mimotopes in healthy subjects. *Front. Immunol.* 2021, 12, 676627.
3. Mazziotta, C.; Lanzillotti, C.; Govoni, M.; Pelliello, G.; Mazoni, E.; Tognon, M.G.; Martini, F.; Rotondo, J.C. Decreased IgG antibody response to viral protein mimotopes of oncogenic Merkel cell polyomavirus in sera from healthy elderly subjects. *Front. Immunol.* 2021, In press.
4. Mazziotta, C.; Lanzillotti, C.; Govoni, M.; Falzoni, S.; Tramarin, M.L.; Mazzoni, E.; Tognon, | Mauro; Martini, F.; Rotondo, J.C. Immunological evidence of an early seroconversion to oncogenic Merkel cell polyomavirus in healthy children and young adults. *Immunology* 2022.
5. Mazziotta, C.; Pelliello, G.; Tognon, M.; Martini, F.; Rotondo, J.C. Significantly low levels of IgG antibodies against oncogenic Merkel cell polyomavirus in sera from females affected by spontaneous abortion. *Front. Microbiol.* 2021, 12, 789991.
6. Saraswati, K.; Phanichkrivalkosil, M.; Day, N.P.J.; Blacksell, S.D. The validity of diagnostic cut-offs for commercial and in-house scrub typhus IgM and IgG ELISAs: A review of the evidence. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2019, 13, e0007158.
7. Touzé, A.; Gaitan, J.; Arnold, F.; Cazal, R.; Fleury, M.J.; Combelas, N.; Sizaret, P.Y.; Guyetant, S.; Maruani, A.; Baay, M.; et al. Generation of Merkel cell polyomavirus (MCV)- like particles and their application to detection of MCV antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 48, 1767–1770.
8. Boldorini, R.; Allegrini, S.; Tognon, M.; Miglio, U.; Rossi, D.; Pawlita, M.; Viscidi, R. Merkel cell carcinoma arising in inguinal lymph node in a patient with von Willebrand disease after multiple blood transfusions. *J. Clin. Virol.* 2014, 60, 73–75.

9. Mazziotta, C.; Christian, J.; Cervellera, F.; Lanzillotti, C.; Touzé, A.; Gaboriaud, P.; Tognon, M.; Martini, F.; Rotondo, J.C. MicroRNA dysregulations in Merkel cell carcinoma: Molecular mechanisms and clinical applications. *J. Med. Virol.* 2023, 95, e28375.
10. Li, J.; Wang, X.; Diaz, J.; Tsang, S.H.; Buck, C.B.; You, J. Merkel Cell Polyomavirus Large T Antigen Disrupts Host Genomic Integrity and Inhibits Cellular Proliferation. *J. Virol.* 2013, 87, 9173–9188.
11. Mazziotta, C.; Lanzillotti, C.; Gafà, R.; Touzé, A.; Durand, M.-A.; Martini, F.; Rotondo, J.C. The role of histone post-translational modifications in Merkel cell carcinoma. *Front. Oncol.* 2022, 0, 578.
12. Rotondo, J.C.; Mazziotta, C.; Lanzillotti, C.; Tognon, M.; Martini, F. Epigenetic Dysregulations in Merkel Cell Polyomavirus-Driven Merkel Cell Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 11464.
13. Nakamura, M.; Morita, A. Immune activity in Merkel cell carcinoma. *J. Dermatol.* 2022, 49, 68–74.
14. Mazzoni, E.; Rotondo, J.C.; Marracino, L.; Selvatici, R.; Bononi, I.; Torreggiani, E.; Touzé, A.; Martini, F.; Tognon, M.G. Detection of Merkel cell polyomavirus DNA in serum samples of healthy blood donors. *Front. Oncol.* 2017, 7, 294.
15. Tagliapietra, A.; Rotondo, J.C.J.C.; Bononi, I.; Mazzoni, E.; Magagnoli, F.; Gonzalez, L.O.; Contini, C.; Vesce, F.; Tognon, M.; Martini, F. Droplet-digital PCR assay to detect Merkel cell polyomavirus sequences in chorionic villi from spontaneous abortion affected females. *J. Cell. Physiol.* 2020, 34, 1888–1894.
16. Calvignac-Spencer, S.; Feltkamp, M.C.W.; Daugherty, M.D.; Moens, U.; Ramqvist, T.; Johne, R.; Ehlers, B. A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Arch. Virol.* 2016, 161, 1739–50.
17. Waterboer, T.; Sehr, P.; Michael, K.M.; Franceschi, S.; Nieland, J.D.; Joos, T.O.; Templin, M.F.; Pawlita, M. Multiplex Human Papillomavirus Serology Based on In Situ–Purified Glutathione S-Transferase Fusion Proteins. *Clin. Chem.* 2005, 51, 1845–1853.
18. Singh, H.; Raghava, G.P.S. ProPred1: prediction of promiscuous MHC Class-I binding sites. *BMC Bioinformatics.* 2003, 22, 1009-1014.
19. Larsen, M.V.; Lundegaard, C.; Lamberth, K.; Buus, S.; Lund, O.; Nielsen, M. Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. *BMC Bioinformatics.* 2007, 8, 424.

RIVENDICAZIONI

1. Un peptide isolato corrispondente ad almeno un epitopo degli antigeni T grande (LT) e/o T piccolo (sT) del virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV), che consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità di almeno il 95% con una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo che consiste di:

Peptide LT-1: KFKEWWRS GGFSFGKAYEYGP (SEQ ID NO. 1);

Peptide LT-2: ASRGAPSGSSPPHSQSSSSGY (SEQ ID NO. 2);

Peptide LT-4: GTWEDLFCDESLSSPEPPSS (SEQ ID NO. 3);

Peptide sT-1: QSGYNARFCRGP GCMLKQL (SEQ ID NO. 4); e

Peptide sT-3: SKCACISCKLSRQHCSLKT (SEQ ID NO. 5).

2. Il peptide isolato secondo la rivendicazione 1, che consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità del 100% con una sequenza amminoacidica scelta tra:

Peptide LT-1: KFKEWWRS GGFSFGKAYEYGP (SEQ ID NO. 1);

Peptide LT-2: ASRGAPSGSSPPHSQSSSSGY (SEQ ID NO. 2);

Peptide LT-4: GTWEDLFCDESLSSPEPPSS (SEQ ID NO. 3);

Peptide sT-1: QSGYNARFCRGP GCMLKQL (SEQ ID NO. 4); e

Peptide sT-3: SKCACISCKLSRQHCSLKT (SEQ ID NO. 5).

3. Una composizione comprendente due o più peptidi secondo le rivendicazioni 1 o 2, preferibilmente comprendente almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 1, almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 2, almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 3, almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 4, e almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 5.

4. Un metodo per il rilevamento di anticorpi contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) in un campione isolato di un fluido biologico comprendente almeno le fasi di:

- (a) porre detto campione isolato di un fluido biologico a contatto con almeno un peptide isolato che consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità di almeno il 95% con una sequenza amminoacidica scelta fra SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ

ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, e SEQ ID NO. 5;

(b) rilevare la formazione di almeno un immunocomplesso fra almeno un anticorpo contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) e detto almeno un peptide del passaggio (a), in cui la formazione dell'immunocomplesso è indicativa della presenza di almeno un anticorpo contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) nel campione isolato.

5
10
15
20
25
30

5. Il metodo secondo la rivendicazione 4 in cui detto almeno un peptide isolato consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità del 100% con una sequenza amminoacidica scelta fra SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, e SEQ ID NO. 5

6. Il metodo secondo la rivendicazione 4 o 5 in cui nel passaggio a) detto campione isolato è posto a contatto con la composizione della rivendicazione 3, preferibilmente con almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 1, almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 2, almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 3, almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 4, e almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 5.

7. Il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 4-6, in cui detti anticorpi contro MCPyV sono anticorpi IgG.

8. Il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 4-7, in cui la rilevazione di un immunocomplesso nella fase b) avviene tramite utilizzo di un anticorpo secondario anti-uomo.

9. Il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 4-8, in cui detto fluido biologico è scelto da un gruppo comprendente siero, plasma, sangue, saliva, urina e liquido cerebrospinale, preferibilmente è siero.

10. Il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 4-9, in cui la formazione di un immunocomplesso viene rilevata mediante un immunosaggio, preferibilmente ELISA indiretto.

11. Il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 4-10 in cui detto campione isolato di fluido biologico viene considerato positivo agli anticorpi contro la proteina LT di MCPyV se viene rivelata la formazione di almeno un immunocomplesso fra un anticorpo contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) e almeno due peptidi scelti fra SEQ ID

NO. 1 (LT-1), SEQ ID NO. 2 (LT-2) e SEQ ID NO. 3 (LT-4).

12. Il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 4-10 in cui detto campione isolato di fluido biologico viene considerato positivo agli anticorpi contro la proteina sT di MCPyV se viene rivelata la formazione di almeno un immunocomplesso fra un anticorpo contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) e entrambi i peptidi con SEQ ID NO. 4 (sT-1), e SEQ ID NO. 5 (sT-3).

13. Il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 4-12 in cui detto fluido biologico è isolato da un soggetto umano.

14. Il metodo secondo la rivendicazione 13, in cui detto campione isolato di un fluido biologico umano è precedentemente isolato da un soggetto scelto fra:

- (i) un paziente affetto da una o più patologie oncologiche, compreso il cancro,
- (ii) un paziente immunocompromesso o immunosoppresso, ad esempio un paziente che ha ricevuto un trapianto d'organo o affetto da AIDS o da una patologia immunodepressiva,
- (iii) un paziente affetto da una o più patologie, comprendente malattie autoimmuni, neurologiche e renali; e
- (iv) un individuo sano con o senza un rischio elevato d'insorgenza del carcinoma delle cellule di Merkel (CCM), ad esempio un soggetto anziano o un donatore di sangue, di cellule staminali e/o di organi.

15. Il metodo secondo la rivendicazione 14, in cui in (i) il cancro è carcinoma delle cellule di Merkel (CCM).

16. Il metodo secondo la rivendicazione 14 in cui il soggetto è affetto da una malattia autoimmune scelta fra artrite reumatoide, spondilite anchilosante e sclerosi multipla, preferibilmente in terapia con uno o più anticorpi monoclonali.

17. Kit diagnostico per la determinazione della presenza di anticorpi contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) in un campione isolato di un fluido biologico di un soggetto sospettato di essere infettato da MCPyV, comprendente almeno:

- (i) almeno un peptide isolato che consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità di almeno il 95% con una sequenza amminoacidica scelta fra SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, e SEQ ID NO. 5; e
- (ii) almeno un reagente per rilevare la formazione di un immunocomplesso fra un

anticorpo contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) e detto almeno un peptide in (i).

- 5 18. Il kit secondo la rivendicazione 17 in cui detto peptide isolato in (i) consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità del 100% con una sequenza amminoacidica scelta fra SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, e SEQ ID NO. 5.
19. Il kit diagnostico secondo la rivendicazione 17 o 18 in cui detto reagente in (ii) comprende un anticorpo secondario anti-uomo.
- 10 20. Il kit diagnostico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 17-19 comprendente una piastra ELISA come supporto solido di saggio.
21. Uso del kit diagnostico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 17-20, per rilevare la presenza di anticorpi contro MCPyV in un campione isolato di un fluido biologico, preferibilmente un fluido biologico umano.
- 15 22. Uso di almeno un peptide isolato che consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità di almeno il 95%, preferibilmente del 100%, con una sequenza amminoacidica scelta fra SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, e SEQ ID NO. 5 come biomarcatore per predire l'insorgenza del cancro delle cellule di Merkel (CCM) associato a virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV).
- 20 23. Un metodo di screening di un soggetto, preferibilmente un soggetto a rischio di sviluppare un cancro, per predire l'insorgenza del cancro delle cellule di Merkel (CCM) comprendente almeno un passaggio a) di porre un campione di un fluido biologico isolato da detto soggetto a contatto con almeno un peptide isolato che consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità di almeno il 95% con una sequenza amminoacidica scelta fra SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, e SEQ ID NO. 5.
- 25 24. Il metodo secondo la rivendicazione 23 comprendente un ulteriore passaggio b) di rilevazione di un immunocomplesso fra almeno un anticorpo contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) e almeno un peptide del passaggio (a), dove la rilevazione di detto immunocomplesso è indicativa della possibile insorgenza del cancro delle cellule di
- 30 Merkel (CCM) in detto soggetto.

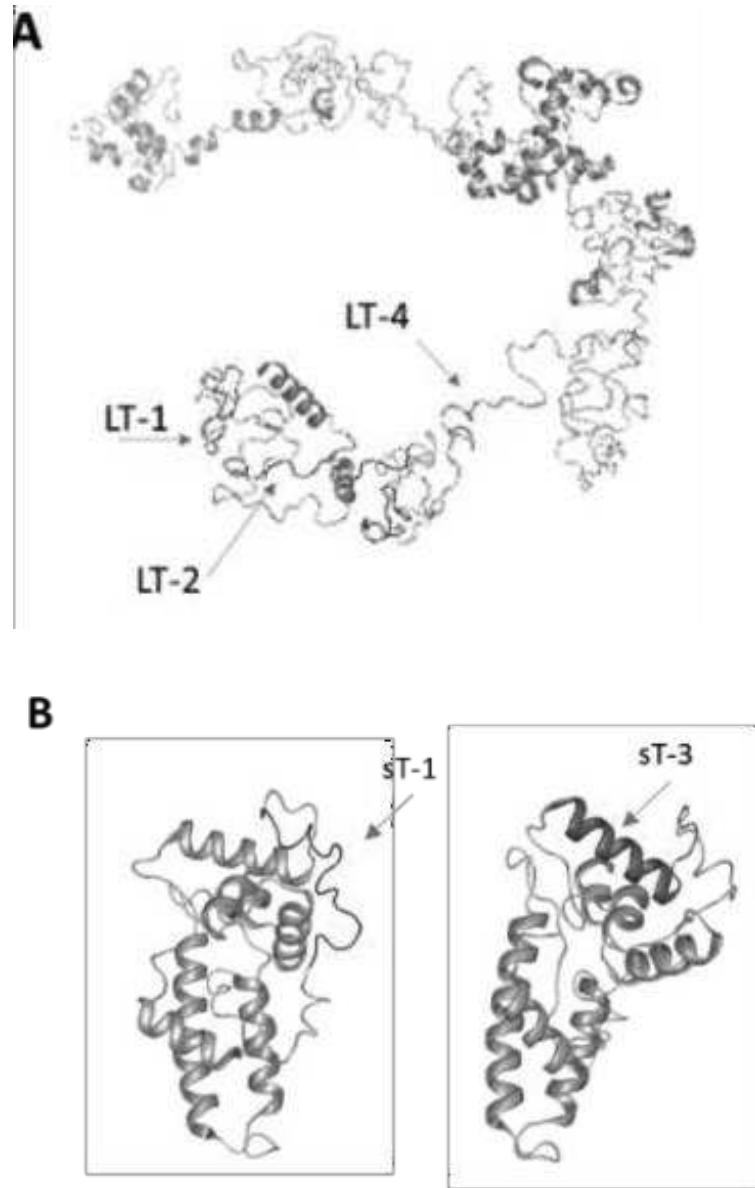


FIG. 1

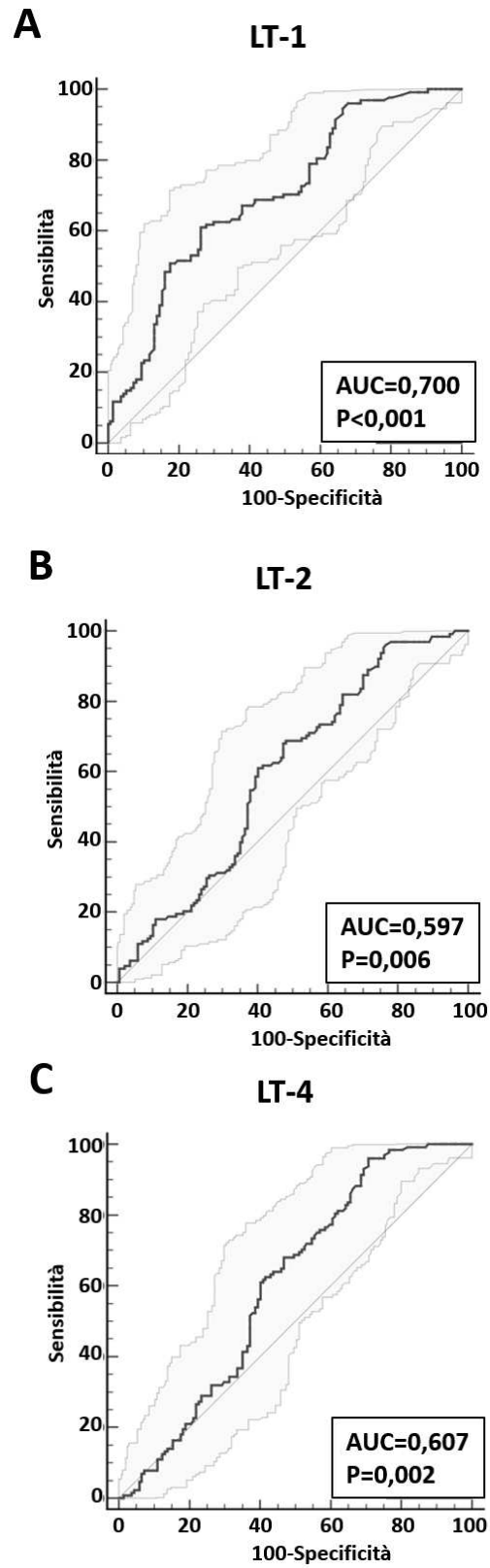
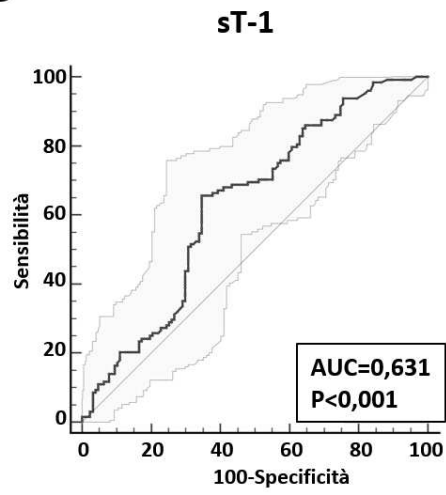


FIG. 2 (1/2)

D



E

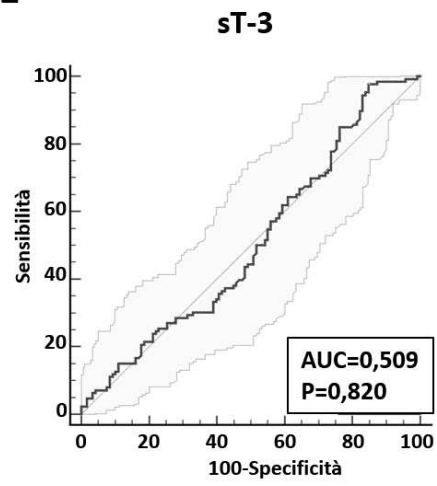


FIG. 2 (2/2)



Ministero delle Imprese e del Made in Italy

DIREZIONE GENERALE SVILUPPO PRODUTTIVO E COMPETITIVITA'-
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

Numero della domanda

IO 130851

IT 202300024003

RAPPORTO DI RICERCA

DOCUMENTI CONSIDERATI DI RILIEVO			
Categoria	Citazione del documento con indicazione, se appropriata, delle parti rilevanti	Rivendicazioni rilevanti	CLASSIFICAZIONE DELLA DOMANDA (IPC)
X	WO 2022/253957 A1 (UNIV DANMARKS TEKNISKE [DK]; UNIV WASHINGTON [US]) 8 December 2022 (2022-12-08)	3	INV. G01N33/569 C07K14/005
Y	* sequences 45,77,78 * -----	1-24	
X	WO 2018/090057 A1 (HUTCHINSON FRED CANCER RES [US]; UNIV WASHINGTON [US]) 17 May 2018 (2018-05-17)	3	
Y	* sequences 15,16 * -----	1-24	
X	WO 2021/247534 A2 (BROAD INST INC [US]; DANA FARBER CANCER INST INC [US]) 9 December 2021 (2021-12-09)	3	
Y	* sequence 2 * -----	1-24	
X	US 2011/182901 A1 (PETER MARTINE [FR] ET AL) 28 July 2011 (2011-07-28)	3	CAMPI TECNICI RICERCATI (IPC) G01N C07K
Y	* sequences 2,3 * -----	1-24	
X	US 2011/135598 A1 (MOORE PATRICK M [US] ET AL) 9 June 2011 (2011-06-09)	1-24	
Y	* paragraphs [0034], [0049], [0050], [0054], [0057]; claim 8; sequences 14,16 * -----	1-24	
Y	WO 2022/053944 A1 (UNIV DEGLI STUDI DI FERRARA [IT]) 17 March 2022 (2022-03-17) * claims 1-12 * -----	1-24	
Questo rapporto di ricerca è stato redatto sulla base di tutte le rivendicazioni			
The Hague		Data di completamento della ricerca 3 April 2024	Esaminatore Gundlach, Björn
CATEGORIA DEI DOCUMENTI CITATI			
X : di particolare rilevanza se considerato singolarmente		T : teoria o principio alla base dell'invenzione	
Y : di particolare rilevanza se combinato con un altro documento della stessa categoria		E : documento brevettuale antecedente, ma pubblicato dopo o alla data di deposito	
A : informazione generica		D : documento citato nella domanda	
O : divulgazione orale		L : documento citato per altre ragioni	
P : documento intermedio	 & : membro della stessa famiglia di brevetti, documento corrispondente	

1

EPO FORM 1503 07.08 (F04C74)

**ALLEGATO AL RAPPORTO DI RICERCA
SULLA DOMANDA DI BREVETTO ITALIANO N.**

**IO 130851
IT 202300024003**

Questo allegato enumera i membri della famiglia di brevetti relativi a documenti brevettuali citati nel summenzionato rapporto di ricerca.

I membri sono indicati come da database dell'Ufficio Europeo dei Brevetti al **03-04-2024**
L'Ufficio Europeo dei Brevetti non si assume alcuna responsabilità per queste indicazioni, che vengono fornite a solo scopo informativo.

Documenti brevettuali citati nel rapporto di ricerca	Data di pubblicazione	Membri della famiglia di brevetti	Data di pubblicazione
WO 2022253957 A1	08-12-2022	EP 4347794 A1 WO 2022253957 A1	10-04-2024 08-12-2022
WO 2018090057 A1	17-05-2018	AU 2017356322 A1 CA 3042890 A1 EP 3538113 A1 IL 266466 A RU 2019116312 A US 2020030378 A1 WO 2018090057 A1	23-05-2019 17-05-2018 18-09-2019 31-07-2019 14-12-2020 30-01-2020 17-05-2018
WO 2021247534 A2	09-12-2021	US 2023248814 A1 WO 2021247534 A2	10-08-2023 09-12-2021
US 2011182901 A1	28-07-2011	NONE	
US 2011135598 A1	09-06-2011	US 2011135598 A1 US 2014037581 A1 US 2016046696 A1 WO 2009079481 A2	09-06-2011 06-02-2014 18-02-2016 25-06-2009
WO 2022053944 A1	17-03-2022	NONE	



Ministero delle Imprese e del Made in Italy

DIREZIONE GENERALE SVILUPPO PRODUTTIVO E COMPETITIVITA'-
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

OPINIONE SCRITTA

N. dossier IO130851	Data di deposito (gg/mm/aa) 13.11.2023	Data di priorità (gg/mm/aa)	N. domanda IT202300024003
Classificazione Internazionale dei Brevetti (IPC) INV. G01N33/569 C07K14/005			
Richiedente UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FERRARA			

Questa opinione fornisce indicazioni riguardanti i seguenti elementi:

- Riquadro N. I Base dell'opinione
- Riquadro N. II Priorità
- Riquadro N. III Non-redazione di un'opinione a riguardo di novità, attività inventiva e applicazione industriale
- Riquadro N. IV Violazione del requisito d'unità dell'invenzione
- Riquadro N. V Dichiarazione motivata a riguardo di novità, attività inventiva o applicazione industriale; citazioni e spiegazioni giustificative della dichiarazione
- Riquadro N. VI Particolari documenti citati
- Riquadro N. VII Difetti particolari nella domanda
- Riquadro N. VIII Osservazioni particolari a riguardo della domanda

	Esaminatore Gundlach, Björn
--	--------------------------------

Riquadro N. I Base dell'opinione

1. Questa opinione è stata redatta sulla base delle ultime rivendicazioni depositate prima dell'inizio della ricerca nella tecnica anteriore.
2. Per quanto concerne eventuali sequenze di nucleotidi e/o amminoacidi descritte nella domanda, questa opinione è stata redatta sulla base di una lista di sequenze:
 - a. formante parte della domanda al momento del deposito della medesima
 - b. fornita successivamente alla data di deposito della domanda, al fine della ricerca di anteriorità
 - accompagnata da una dichiarazione che le informazioni contenute nella lista di sequenze non vanno oltre quelle contenute nella domanda al momento del deposito
3. Per quanto concerne ogni eventuale sequenza di nucleotidi e/o amminoacidi descritta nella domanda, questa opinione è stata redatta nei limiti in cui un parere significativo possa essere espresso in mancanza di una lista di sequenze in formato conforme allo standard WIPO ST.26.
4. Note aggiuntive:

Riquadro N. VDichiarazione motivata a riguardo di novità, attività inventiva o applicazione industriale; citazioni e spiegazioni giustificative della dichiarazione

1. 1. Dichiarazione

Novità (N)	Sì: Rivendicazioni 1, 2, 5, 7, 8, 11, 12, 17-22
	No: Rivendicazioni 3, 4, 6, 9, 10, 13-16, 23, 24
Attività inventiva (IS)	Sì: Rivendicazioni
	No: Rivendicazioni 1-24
Applicazione industriale (IA)	Sì: Rivendicazioni 1-24
	No: Rivendicazioni

2. 2. Citazioni e spiegazioni

si veda l'allegato

Riquadro N. VIII Osservazioni particolari a riguardo della domanda

si veda l'allegato

Re Item VIII

Certain observations on the application

Claim 22 reads:

"Use of at least an isolated peptide consisting of an amino acid sequence having an identity of at least 95%, preferably 100%, with an amino acid sequence chosen from SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, and SEQ ID NO. 5 as a biomarker to predict the occurrence of Merkel cell cancer (CCM) associated with Merkel cell polyoma virus (MCPyV)".

It is not clear what is meant. SEQ ID NO:1-5 are artificial peptides, which do not occur in nature. They are fragments of the known full length proteins of the virus. There is neither support nor is it clear how the fragments of SEQ ID No:1-5 could work as a biomarker.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Reference is made to the following documents:

- D1 WO 2022/253957 A1 (UNIV DANMARKS TEKNISKE [DK]; UNIV WASHINGTON [US]) 8 December 2022 (2022-12-08)
- D2 WO 2018/090057 A1 (HUTCHINSON FRED CANCER RES [US]; UNIV WASHINGTON [US]) 17 May 2018 (2018-05-17)
- D3 WO 2021/247534 A2 (BROAD INST INC [US]; DANA FARBER CANCER INST INC [US]) 9 December 2021 (2021-12-09)
- D4 US 2011/182901 A1 (PETER MARTINE [FR] ET AL) 28 July 2011 (2011-07-28)
- D5 US 2011/135598 A1 (MOORE PATRICK M [US] ET AL) 9 June 2011 (2011-06-09)
- D6 WO 2022/053944 A1 (UNIV DEGLI STUDI DI FERRARA [IT]) 17 March 2022 (2022-03-17)

The present application does not meet the criteria of patentability, because the subject-matter of claim 3 is not new.

D1 discloses:

Peptides of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) with the following sequence identities:

SEQ ID NO:1:

The query sequence SEQ ID NO:1 has 100 % identity (100 % similarity) over 21 positions in a common overlap (range (q:s): 1-21:10-30) with subject GSP:BMD66512 (length: 244) from D1 (=SEQ ID NO:77).

The query sequence SEQ ID NO:1 has 100 % identity (100 % similarity) over 10 positions in a common overlap (range (q:s): 2-11:1-10) with subject GSP:BMD66480 (length: 10) from D1 (=SEQ ID NO:45).

The query sequence SEQ ID NO:1 has 100 % identity (100 % similarity) over 10 positions in a common overlap (range (q:s): 4-13:1-10) with subject GSP:BMD66448 (length: 10) from D1 (=SEQ ID NO:13).

The query sequence SEQ ID NO:1 has 100 % identity (100 % similarity) over 10 positions in a common overlap (range (q:s): 6-15:1-10) with subject GSP:BMD66442 (length: 10) from D1 (=SEQ ID NO:7).

The query sequence SEQ ID NO:1 has 100 % identity (100 % similarity) over 10 positions in a common overlap (range (q:s): 10-19:1-10) with subject GSP:BMD66493 (length: 10) from D1 (=SEQ ID NO:58).

SEQ ID NO:2:

The query sequence SEQ ID NO:2 has 100 % identity (100 % similarity) over 21 positions in a common overlap (range (q:s): 1-21:46-66) with subject GSP:BMD66512 (length: 244) from D1 (=SEQ ID NO:77).

SEQ ID NO:3:

The query sequence SEQ ID NO:3 has 100 % identity (100 % similarity) over 20 positions in a common overlap (range (q:s): 1-20:128-147) with subject GSP:BMD66512 (length: 244) from D1 (=SEQ ID NO:77).

SEQ ID NO:4:

The query sequence SEQ ID NO:4 has 100 % identity (100 % similarity) over 19 positions in a common overlap (range (q:s): 1-19:17-35) with subject GSP:BMD66513 (length: 107) from D1 (=SEQ ID NO:78).

The query sequence SEQ ID NO:**4** has 100 % identity (100 % similarity) over 10 positions in a common overlap (range (q:s): 6-15:1-10) with subject GSP:BMD66507 (length: 10) from D1 (=SEQ ID NO:**72**).

The query sequence SEQ ID NO:**4** has 100 % identity (100 % similarity) over 10 positions in a common overlap (range (q:s): 1-10:1-10) with subject GSP:BMD66444 (length: 10) from D1 (=SEQ ID NO:**9**).

SEQ ID NO:5:

The query sequence SEQ ID NO:**5** has 100 % identity (100 % similarity) over 19 positions in a common overlap (range (q:s): 1-19:38-56) with subject GSP:BMD66513 (length: 107) from D1 (=SEQ ID NO:**78**).

The query sequence SEQ ID NO:**5** has 100 % identity (100 % similarity) over 10 positions in a common overlap (range (q:s): 8-17:1-10) with subject GSP:BMD66478 (length: 10) from D1 (=SEQ NO:**43**).

The query sequence SEQ ID NO:**5** has 100 % identity (100 % similarity) over 10 positions in a common overlap (range (q:s): 9-18:1-10) with subject GSP:BMD66459 (length: 10) from D1 (=SEQ ID NO:**24**).

The query sequence SEQ ID NO:**5** has 100 % identity (100 % similarity) over 9 positions in a common overlap (range (q:s): 11-19:1-9) with subject GSP:BMD66508 (length: 10) from D1 (=SEQ ID NO:**73**).

None of the peptides fulfils the criteria of claim 1, that the sequence must have a sequence identity of 95% (over the length of any of SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 or 5). Claims 1 and 2 are novel over D1.

D1 discloses a composition (here in the form of one peptide represented by SEQ ID NO: 77 or 78) comprising two or more peptides according to claims 1 or 2, namely (see SEQ ID NO:77 and 78 above) comprising at least one peptide consisting of the amino acid sequence with SEQ ID NO.1, at least one peptide consisting of the amino acid sequence with SEQ ID NO. 2, at least one peptide consisting of the amino acid sequence with SEQ ID NO. 3 (cf. SEQ ID NO:77) and at least one peptide consisting of the amino acid sequence with SEQ ID NO. 4, and at least one peptide consisting of the amino acid sequence with SEQ ID NO. 5 (cf. SEQ ID NO:78).

Claim 3 is not novel over D1.

D1 discloses epitopes for T cells. A method of detection of antibodies as in claim 4 or a kit comprising a reagent to detect the formation of an immune complex between an antibody and a peptide as in claim 17 is not disclosed.

D2 discloses a composition as in claim 3 (cf. D2, SEQ ID NO:15) comprising a peptide of SEQ ID NO:1, 2, 3 and a composition (cf. D2, SEQ ID NO:16) comprising a peptide of SEQ ID NO: 4 and 5.

D3:

The query sequence SEQ ID NO:1 has 100 % identity (100 % similarity) over 21 positions in a common overlap (range (q:s): 1-21:89-109) with subject GSP:BKK30191 (length: 817) from D3 (=SEQ ID NO:2). The peptide also comprises SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:3. Claim 3 is not novel over D3.

D4 discloses

Two peptides (SEQ ID NO:2 and 3). The peptide in D4 according to SEQ ID NO:2 comprises peptides according to SEQ ID NO:1, 2 and 3 and the peptide according to SEQ ID NO:3 in D4 comprises the peptides according to SEQ ID NO:4 and 5 of the application. These peptides represent a composition as in claim 3, which is hence not novel, let alone inventive over D4.

D4 discloses that the antigens can be used to provide antibodies but a detection of antibodies in a sample is not disclosed. D4 is not relevant for novelty of the other claims.

D5:

The query sequence SEQ ID NO:1 has 100 % identity (100 % similarity) over 21 positions in a common overlap (range (q:s): 1-21:89-109) with subject CAS: 2016_2115725_1164414076_1 (length: 432) from D5 (=SEQ ID NO:16). SEQ ID NO:16 also comprises SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:3. SEQ ID NO:14 comprises SEQ ID NO: 4 and 5. Claim 3 is not novel, let alone inventive over D5.

D5 discloses furthermore subject-matter of:

- claim 4: (cf. D5, [0034], claim 8, here: method for assaying MCPyV (=MCV) in a tissue or fluid sample of a patient and assaying for the presence of an antibody binding to a MCV polypeptide
- claim 6 ([0034], claim 8, SEQ ID NO:14, 16)
- claims 9, 10 ([0049],[0050])
- claim 13 ([0057])
- claims 14-16 ([0049],[0054])
- claims 23, 24 ([0049]).

The present application does not meet the criteria of patentability, because the subject-matter of claims 1-24 does not involve an inventive step.

D5 is the closest prior art. Claim 1 differs from D5 in that the MCPyV antigens are comprised in shorter fragments than in SEQ ID NO:14 or 16 in D5. There is no technical effect known. The objective technical problem to be solved is to provide an alternative peptide comprising the antigens.

This is considered not to be inventive. Normally, epitopes for antibodies are about 6-8 amino acids long. From D5 but also from D1-D4 numerous different peptides are known that comprise the relevant MCPyV antigens. D1 for example discloses (SEQ ID NO:77) a peptide comprising all of SEQ ID NO:1-3 but also a peptide (SEQ ID NO:45) being 10 amino acids long comprising only one epitope. D1-D5 hence disclose peptides being variations of SEQ ID NO:1-5 being longer or shorter.

The skilled person would see it as logical to focus on one or more epitopes, i.e. using peptides comprising one, two or more epitopes. It is logical that the use of more than one epitope in a detection assay would increase the sensitivity. The skilled person would provide an assay having the desired sensitivity and specificity optimised for the detection of the disease to be diagnosed.

None of the other claims being novel comprise an inventive step. Mere workshop modifications well known to the skilled person are concerned. It would be logical for example to provide the necessary reagents for an ELISA in the form of a test kit as in claims 17-22.

Presence of inventive step over D5 alone or in combination with D1-D4 cannot be acknowledged.

Alternatively, D6 could be used as closest prior art in combination with any of D1-D5 as complementing document. D6 discloses subject-matter of the claims (cf. claims) but not the same MCPyV-antigens. The claims differ from D6 in that different antigens are used. There is no new technical effect over D6 known. The objective technical problem to be solved is to provide an alternative diagnostic assay. The solution is not inventive. The skilled person would know from D5 that small- and large T antigens from MCPyV comprises antigens or epitopes that are suitable to diagnose infection with MCPyV. It would be straightforward and not inventive to replace the antigens known from D6 with those of D5. The skilled person would know that the length of peptides does not play a role and that it is important that the desired number of epitopes depending on the desired sensitivity and specificity of the assay is used. Subject-matter of the claims is also not inventive over the combination of D6 with D5.

No formal objection to lack of unity was raised but the five peptides of claim 1 are considered not to comprise a special technical feature that would link the claimed inventions with a single general inventive concept.

Subject-matter of all claims is industrially applicable.

PEPTIDI SINTETICI E LORO USO IN DIAGNOSTICA PER RILEVARE GLI ANTICORPI CONTRO IL VIRUS POLIOMA DELLE CELLULE DI MERKEL (MCPYV)

RIASSUNTO

La presente invenzione si riferisce a peptidi isolati corrispondenti ad almeno un epitopo degli
5 antigeni T grande (LT) e/o T piccolo (sT) del virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV)
e al loro utilizzo in un metodo per il rilevamento di anticorpi contro il virus polioma delle
cellule di Merkel in un campione isolato di fluido biologico. Un kit diagnostico per la
determinazione della presenza di anticorpi contro il virus polioma delle cellule di Merkel
(MCPyV) in un campione di fluido biologico isolato che utilizza detti peptidi è anch'esso un
10 oggetto dell'invenzione.

PEPTIDI SINTETICI E LORO USO IN DIAGNOSTICA PER RILEVARE GLI ANTICORPI CONTRO IL VIRUS POLIOMA DELLE CELLULE DI MERKEL (MCPyV)

SETTORE DELL'INVENZIONE

La presente invenzione appartiene al settore dell'immunodiagnostica.

- 5 In particolare, l'invenzione si riferisce a immunosaggi per rilevare nel siero gli anticorpi contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV), a peptidi sintetici lineari corrispondenti ad epitopi degli antigeni T grande (LT) e T piccolo (sT) di MCPyV e ai loro usi diagnostici.

STATO DELLA TECNICA ANTERIORE

10 Il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) è un piccolo virus oncogeno a DNA appartenente alla famiglia dei poliomaviridae [3,9]. MCPyV è considerato l'unico tra i virus polioma ad avere attività oncogena nell'uomo [10]. La sua attività oncogena è stata infatti associata all'insorgenza e progressione del carcinoma delle cellule di Merkel (CCM). MCPyV è attualmente considerato dall'Organizzazione mondiale della sanità/Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (WHO/IARC) come agente cancerogeno del gruppo 2A (probabilmente cancerogeno per l'uomo). Il
15 genoma bicatenario a DNA di MCPyV comprende tre domini funzionali: uno precoce, uno tardivo e la Non coding control region (NCCR) [11]. La regione tardiva contiene i geni codificanti per le proteine strutturali denominate proteine virali ("Viral protein") 1 e 2 (VP1 e VP2). La regione precoce contiene i geni che codificano per le proteine oncogene virali denominate antigeni T grande (large T, LT), T piccolo (small T, sT), e antigeni di 57kT. Nel 2013 è stato inoltre identificato un gene
20 codificante per la proteina "Alternative frame of the large T ORF" (ALTO) [11]. Similmente ad altri virus polioma umani, le proteine oncogene LT ed sT di MCPyV contengono una serie di motivi e domini funzionali che svolgono ruoli chiave nella replicazione e trascrizione del genoma virale [10]. È stato dimostrato che gli eventi chiave dell'attività oncogena del virus MCPyV comprendono l'integrazione del genoma virale nel genoma della cellula ospite, l'espressione incontrollata delle
25 proteine oncogene LT e sT e la regione codificante per il gene LT troncata [10].

Il CCM è un raro ma altamente aggressivo tumore epiteliale di origine neuroendocrina [12] con un'incidenza annuale di circa 2,4 e 3 casi ogni milione di individui all'anno, rispettivamente in Europa e negli USA. Il CCM presenta un tasso di mortalità a 5 anni di circa il 63%, mentre un terzo dei pazienti, alla diagnosi primaria, presenta metastasi ai linfonodi o locoregionali [9]. Il CCM insorge
30 più frequentemente in persone anziane con un'età media di insorgenza di 69 anni, soggetti bianchi di entrambi i generi con una storia pregressa di una lunga esposizione ai raggi UV del sole. Il tumore ha quindi una predilezione d'insorgenza nelle regioni anatomiche più esposte al sole, specialmente nella

regione della testa e del collo [9]. Grazie allo sviluppo di nuove tecniche diagnostiche e all' aumento della popolazione anziana, il tasso di incidenza riportato è costantemente aumentato negli ultimi decenni.

Un fattore di rischio importante nello sviluppo del CCM è rappresentato dall'immunosoppressione/immunocompromissione [1], tanto da aumentare il rischio relativo di ben 16 volte rispetto alla popolazione sana [13]. Infatti, circa il 10% dei pazienti affetti da CCM mostra deficit immunitari. I pazienti immunosoppressi sono particolarmente più inclini in generale a sviluppare tumori virus-associati, tra cui il sarcoma di Kaposi e il linfoma di Burkitt, neoplasie associate a virus erpetici, rispettivamente HHV6-8 e EBV, oltre al CCM associato a MCPyV. L'immunosoppressione può portare all'insorgenza di infezioni persistenti, anche in presenza di antigeni virali immunogenici [13]. Il CCM è infatti più frequente nei pazienti con leucemia o infezione da HIV e in quelli immunosoppressi, a seguito di un trapianto di organi o per altre cause. La mortalità è più elevata negli individui immunosoppressi che nei pazienti immunocompetenti. Questi risultati sottolineano il ruolo cruciale di una sorveglianza immunitaria efficiente nel controllo della crescita e della progressione tumorale.

Una delle cause dell'immunodepressione è il trattamento di malattie autoimmuni con farmaci biologici, in particolare con anticorpi monoclonali. Dal 2013 il mercato di tali farmaci mostra un incremento annuale compreso tra il 7.2% e il 18.3%, superando i 98 miliardi di dollari negli Stati Uniti d'America. L'aumento progressivo dell'utilizzo dei farmaci biologici ha generato un conseguente aumento di pazienti immunodepressi. Un ulteriore fattore rilevante per l'abbassamento delle difese immunitarie e quindi per la riattivazione di MCPyV, è riconducibile nei paesi industrializzati al progressivo aumento dell'età media della popolazione. Ad esempio, si stima che in Italia, la popolazione attuale di individui di 80 anni e oltre, che rappresentano ormai il 7% della popolazione totale, sia attualmente raddoppiata rispetto a quella di 25 anni fa, passando da 1 milione 955 mila a 4 milioni 207 mila persone.

Poiché i pazienti affetti da malattie autoimmuni sottoposti a terapia con farmaci monoclonali presentano un aumento dell'incidenza del CCM [8], è di primaria importanza la sorveglianza immunologica in pazienti affetti da malattie autoimmuni, quali artrite reumatoide, spondilite anchilosante e da sclerosi multipla trattati con anticorpi monoclonali. Inoltre, le patologie indotte da MCPyV, quali il carcinoma delle cellule di Merkel (CCM), presentano un decorso clinico lento nei pazienti affetti da malattie autoimmuni, in terapia con anticorpi monoclonali. Infatti, l'insorgenza del CCM avviene prevalentemente non prima di un anno dall'inizio del trattamento con gli anticorpi monoclonali. È quindi fondamentale una sorveglianza prolungata nel tempo dei livelli di anticorpi

contro MCPyV presenti nei sieri di questi pazienti, almeno ogni sei mesi, con l'obiettivo di garantire un esito positivo.

Considerato quanto detto in precedenza, vi è la necessità di sviluppare nuovi metodi di analisi/saggi immunologici che siano specifici, rapidi e a basso costo e che consentano di identificare in maniera selettiva e specifica anticorpi contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV, che sono considerate le proteine chiave dell'insorgenza del CCM. Ciò è particolarmente utile in alcune classi di individui sani e pazienti, tra cui: (i) soggetti sani che possono avere un rischio elevato d'insorgenza del CCM, quali soggetti anziani o donatori di sangue, di cellule staminali e di organi; (ii) pazienti affetti da diverse patologie oncologiche, compreso il cancro, incluso il CCM; (iii) pazienti immunocompromessi o immunosoppressi che hanno ricevuto un trapianto d'organo o malati di AIDS o altre patologie immunodepressive; (iv) pazienti affetti da diverse patologie, quali malattie autoimmuni, neurologiche e renali.

Metodi diagnostici per MCPyV attuali o alternativi

Diversi gruppi di ricerca, compresi gli inventori della presente invenzione, hanno sviluppato ed impiegato tecniche di biologia e genetica molecolare, tra le quali la reazione a catena della polimerasi "polymerase chain reaction" (PCR), sia qualitativa che quantitativa, per identificare la presenza di sequenze genomiche (DNA) di MCPyV, in svariate e diverse tipologie di campioni umani, tra cui siero, sangue, tessuti tumorali e linee cellulari [14,15].

Gli attuali approcci metodologici per rilevare la presenza di anticorpi sierici contro le proteine del virus MCPyV includono saggi di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) relativamente laboriosi, costosi e caratterizzati da una elevata durata procedurale. La maggior parte di questi metodi immunologici sono basati sull'uso, come antigeni virali, di "virus-like particles" (VLP), note per essere aggregati di proteine capsidiche ricombinanti di MCPyV che si auto-assemblano *in vitro* [7]. Tuttavia, l'uso delle VLP è una limitazione metodologica di questo tipo di saggi immunologici. Infatti, la sintesi delle VLP prevede un numero elevato di passaggi laboriosi: dalla produzione *in vitro* di batteri ricombinanti, all'isolamento, quantificazione ed infine l'uso delle VLP stesse nei saggi immunologici, che a loro volta prevedono diversi laboriosi passaggi. Inoltre, l'uso di VLP potrebbe anche incrementare la probabilità di possibili cross-reazioni tra diversi virus poliovirus (PyV), che possono pertanto portare all'ottenimento di risultati falsi. Infatti, è noto che i PyV presentano un certo grado di omologia di sequenza [16]. Altri studi riportano lo sviluppo di metodi ELISA basati sul rilevamento multiplo di anticorpi anti-virali denominato "Multiplex Serology", basato sull'impiego di microsferi fluorescenti, in combinazione con la glutatione S-transferasi (GST) [17]. Una delle maggiori limitazioni di tali approcci immunologici è che questi sistemi impiegano capsomeri virali

come antigeni per le immunoreazioni. Gli inventori hanno recentemente sviluppato e validato un test ELISA indiretto basato sull'uso di peptidi sintetici lineari che mimano porzioni immunogeniche delle proteine strutturali capsidiche di MCPyV VP1 e VP2 per il rilevamento di anticorpi umani sierici generati contro le VP1 e VP2 di MCPyV [2], descritto nella domanda di brevetto WO202253944.

5 Tuttavia, il metodo descritto in WO202253944 non consente di valutare la presenza di un possibile processo di trasformazione/tumorigenico in atto nel soggetto. Infatti, la ricerca di anticorpi generati contro le proteine capsidiche/strutturali di MCPyV VP1 e VP2 consente di valutare solamente la risposta immunitaria del soggetto in esame contro l'infezione/virioni di MCPyV.

10 WO200979481 descrive sequenze amminoacidiche che mimano le proteine capsidiche VP di MCPyV.

Attualmente in commercio non sono ancora disponibili metodi specifici per rilevare nell'uomo anticorpi sierici contro MCPyV. Tuttavia, tali metodi saranno sempre più richiesti a causa dell'aumento dei pazienti immunodepressi e/o di età avanzata e quindi delle patologie causate da MCPyV nella popolazione umana.

15 In particolare, non sono noti metodi che consentano di valutare la presenza di un processo tumorigenico in atto in un soggetto dovuto alla presenza di MCPyV.

Pertanto vi è ancora la necessità di un test/saggio immunologico per il rilevamento di anticorpi contro MCPyV, in particolare contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV, che sia standardizzato, specifico, sensibile, rapido, a basso costo e privo di reattività crociata.

20 **RIASSUNTO DELL'INVENZIONE**

Gli inventori forniscono una soluzione del problema tecnico sopra esposto fornendo un test immunologico, basato in particolare su ELISA indiretto, specifico e rapido, per rilevare la presenza di anticorpi IgG contro le proteine oncogene LT e sT del virus oncogeno poliovirus umano MCPyV, mediante l'uso di peptidi sintetici, anche denominati mimotopi. Vantaggiosamente, il metodo non
25 prevede l'uso di proteine ricombinanti come antigeni.

In particolare, la presente invenzione comprende l'identificazione di brevi sequenze peptidiche che rappresentano epitopi specifici e bersagli immunologici selettivi per gli anticorpi presenti nei sieri e altri fluidi umani contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV. Le proteine LT e sT di MCPyV si comportano come oncogeni attivati e sono responsabili dell'insorgenza del tumore della cute denominato carcinoma delle cellule di Merkel.
30

La presente invenzione riguarda anche un kit diagnostico per la rilevazione di anticorpi contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV nel siero e nei fluidi biologici umani.

Il metodo e il kit dell'invenzione sono particolarmente vantaggiosi per l'uso in pazienti immunodepressi ed individui a rischio come individui anziani. Questi soggetti sono infatti potenzialmente esposti alla riattivazione del virus MCPyV, ubiquitario nell'uomo, ma mantenuto sotto controllo in condizioni di latenza da un sistema immunitario sano. Nei pazienti affetti da malattie autoimmuni in terapia con anticorpi monoclonali è necessario il monitoraggio continuo degli anticorpi sierici contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV, tipicamente, almeno una volta ogni sei mesi. Pertanto il kit qui descritto può essere vantaggiosamente utilizzato periodicamente sugli stessi pazienti durante il trattamento con anticorpi monoclonali, che può durare anche diversi anni.

È quindi un primo aspetto della presente invenzione un peptide isolato corrispondente ad almeno un epitopo del virus poliovirus delle cellule di Merkel (MCPyV), in particolare corrispondente ad almeno un epitopo dell'antigene T grande (LT) e/o T piccolo (sT), che consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità di almeno il 95% con una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo che consiste di SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4 e SEQ ID NO. 5. Detto peptide isolato è caratteristico di MCPyV e specifico, nel senso che non reagisce in modo crociato con antigeni/epitopi di altri virus poliovirus.

Preferibilmente, detto peptide consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità del 100% con una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo che consiste di SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4 e SEQ ID NO. 5

Un secondo aspetto della presente invenzione è una composizione comprendente due o più peptidi aventi sequenza SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, o SEQ ID NO. 5. Detta composizione può contenere qualunque combinazione dei peptidi sopra indicati, può contenere ad esempio due, tre, quattro o cinque peptidi scelti fra i peptidi sopra indicati. In una realizzazione, detta composizione comprende almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 1, almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 2, almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 3, almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 4, e almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 5.

Un terzo aspetto della presente invenzione è un metodo *in vitro* per il rilevamento di anticorpi contro il virus poliovirus delle cellule di Merkel (MCPyV) in un campione isolato di un fluido biologico comprendente almeno le fasi di:

- (a) porre detto campione isolato di un fluido biologico a contatto con almeno un peptide isolato che consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità di almeno il 95% con una

sequenza amminoacidica scelta fra SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, e SEQ ID NO. 5; e

(b) rilevare la formazione di almeno un immunocomplesso fra almeno un anticorpo contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) e almeno un peptide del punto (a), qui denominato anche come antigene, in cui la formazione dell'immunocomplesso è indicativa della presenza di almeno un anticorpo contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) nel campione isolato.

In una realizzazione preferita detto campione isolato di un fluido biologico è posto a contatto con tutti i peptidi che consistono di una sequenza amminoacidica avente una identità di almeno il 95% con una sequenza amminoacidica di SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, e SEQ ID NO. 5.

Preferibilmente, detto fluido biologico è umano, cioè è stato precedentemente prelevato da un soggetto umano.

Un quarto aspetto della presente invenzione è un kit diagnostico per la determinazione di anticorpi contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV), in un campione isolato di un fluido biologico, preferibilmente umano, di un soggetto sospettato di essere infettato da MCPyV, il kit comprendente almeno: (I) almeno un peptide isolato che consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità di almeno il 95% con una sequenza amminoacidica scelta fra SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, e SEQ ID NO. 5; e (II) almeno un reagente per rilevare la formazione di un immunocomplesso fra almeno un anticorpo contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) e detto almeno un peptide in (I).

Secondo una forma di realizzazione preferita detto reagente in (II) comprende un anticorpo secondario anti-uomo.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Figure

Figura 1: Visualizzazione tridimensionale delle strutture delle proteine LT e sT e localizzazione dei peptidi. A) modello tridimensionale (3D) predetto dell'LT e localizzazione dei peptidi LT-1, LT-2 e LT-4. B) struttura 3D predetta della proteina sT e localizzazione dei peptidi sT-1 e sT-2.

Figura 2: Curve "Receiver Operating Characteristic (ROC)". Le curve ROC sono state computate sulla base dei valori di densità ottica (OD) ottenuti su sieri di controllo MCPyV-positivi (n=128) e MCPyV-negativi (n=137), sia per i peptidi MCPyV LT (A, B, C) che sT (D, E).

Definizioni

Nell'ambito della presente invenzione, per "peptide" si intende un composto organico risultante dall'unione di due o più molecole di amminoacidi (ad es. un dipeptide, un tripeptide, un polipeptide) riuniti attraverso legami peptidici (un legame amminoacidico che si forma tra il gruppo α -carbossilico di un amminoacido e il gruppo α -amminico di un altro amminoacido), con un peso molecolare inferiore ai 5.000 dalton.

Nell'ambito della presente invenzione, per "virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV)" si intende un piccolo virus oncogeno a DNA bicatenario, appartenente alla famiglia dei Poliomaviridae, che secondo le indicazioni della WHO/IARC presenta un'attività oncogena confermata nell'uomo, associata all'insorgenza e progressione del carcinoma delle cellule di Merkel (CCM).

Nell'ambito della presente invenzione, per "carcinoma delle cellule di Merkel" si intende un raro e altamente aggressivo tumore epiteliale di origine neuroendocrina.

Nell'ambito della presente invenzione, per "proteina oncogena virale" si intende una proteina codificata dai geni compresi nella regione precoce, che appartiene almeno ad un gruppo tra: antigeni T grande (large T, LT), T piccolo (small T, sT), 57kT, e la proteina "Alternative frame of the large T ORF" (ALTO). In particolare, le oncoproteine hanno un ruolo chiave nella replicazione e trascrizione del genoma virale (ad es. le proteine oncogene LT ed sT di MCPyV).

Nell'ambito della presente invenzione, per "paziente immunosoppresso" si intende un paziente sottoposto ad un trattamento medico-farmacologico che prevede l'assunzione da parte del paziente di almeno un farmaco immunosoppressivo (per es. un farmaco biologico, in particolare un anticorpo monoclonale), capace di inibire la risposta del sistema immunitario ad antigeni estranei all'organismo oppure un soggetto che ha ricevuto un trapianto d'organo o un soggetto malato di patologie immunodepressive, ad es. quelle a eziologia autoimmunitaria (ad es. artrite reumatoide, spondilite anchilosante, sclerosi multipla), malattie neoplastiche, AIDS. Paziente immunocompromesso è un sinonimo.

Nell'ambito della presente invenzione, per "biomarcatore" si intende un indicatore biologico o biochimico che può essere messo in relazione con l'insorgenza o lo sviluppo di una patologia, come la presenza di un agente infettivo o l'esistenza di cancro. "Predittore di rischio" è un sinonimo.

In una forma di realizzazione, un campione isolato di fluido biologico viene considerato positivo agli anticorpi contro la proteina LT di MCPyV se viene rivelata la formazione di un immunocomplesso fra un anticorpo e almeno due peptidi (antigeni) scelti fra SEQ ID NO. 1 (LT-1), SEQ ID NO. 2 (LT-2) e SEQ ID NO. 3 (LT-4).

In una forma di realizzazione, un campione isolato di fluido biologico viene considerato positivo agli anticorpi contro la proteina sT di MCPyV se viene rivelata la formazione di un immunocomplesso fra un anticorpo e entrambi i peptidi (antigeni) con SEQ ID NO. 4 (sT-1), e SEQ ID NO. 5 (sT-3).

In una forma di realizzazione preferita, suddetti anticorpi contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV possibilmente presenti nel campione di fluido biologico sono anticorpi IgG umani.

Secondo un'altra forma di realizzazione preferita, la rilevazione di un immunocomplesso avviene tramite utilizzo di un anticorpo secondario anti-uomo. Qualunque anticorpo secondario anti-uomo di comune utilizzo nel settore può essere usato, ad esempio un anticorpo di capra.

In un'ulteriore forma di realizzazione preferita, detto fluido biologico è umano e viene scelto da un gruppo comprendente siero, plasma, sangue, saliva, urina o liquido cerebrospinale. Tra questi, il siero è il più preferito.

In un'ulteriore forma di realizzazione preferita, la formazione di un immunocomplesso viene rilevata mediante un immunosaggio, preferibilmente scelto fra immunoprecipitazione, immunodosaggio, preferibilmente ELISA o RIA o saggio immunologico a fluorescenza, western blot, analisi FACS o una tecnica immunocitochimica/immunoistochimica. Tra questi, il saggio ELISA indiretto è il più preferito.

In un'ulteriore forma di realizzazione preferita il campione isolato di fluido biologico è stato isolato da un soggetto scelto fra:

(i) un paziente affetto da una o più patologie oncologiche, comprendente il cancro. Il cancro è preferibilmente carcinoma delle cellule di Merkel (CCM);

(ii) un paziente immunocompromesso o immunosoppresso, ad esempio un soggetto che ha ricevuto un trapianto d'organo o malato di AIDS o altre patologie immunodepressive,

(iii) un paziente affetto da una o più patologie, comprendenti malattie autoimmuni, malattie neurologiche e malattie renali;

(iv) un individuo sano con o senza un rischio elevato d'insorgenza del carcinoma delle cellule di Merkel (CCM), come ad esempio un soggetto anziano o un donatore di sangue, di cellule staminali e/o di organi. Per soggetto anziano si intende un soggetto avente più di 65 anni.

Preferibilmente, detto soggetto ha un rischio medio o elevato d'insorgenza del carcinoma delle cellule di Merkel (CCM).

In una realizzazione preferita, il soggetto è affetto da una malattia autoimmune scelta fra artrite reumatoide, spondilite anchilosante e sclerosi multipla e può essere in terapia con uno o più anticorpi monoclonali.

5 In un'altra forma di realizzazione preferita il kit diagnostico comprende una piastra ELISA come supporto solido di saggio.

In un'ulteriore forma di realizzazione preferita il kit diagnostico viene utilizzato nel rilevamento della presenza di anticorpi contro MCPyV in un fluido biologico umano.

Il kit diagnostico della presente invenzione può essere vantaggiosamente utilizzato nell'automazione del processamento di analisi dei campioni nei laboratori ospedalieri di analisi cliniche.

10 I peptidi dell'invenzione possono anche essere usati come predittori di rischio, e/o biomarcatori dell'insorgenza del cancro delle cellule di Merkel (CCM) associato al virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV). Infatti, la presenza nel siero o in altri fluidi biologici umani di anticorpi contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV è indicativa di un rischio più alto di sviluppare un cancro, come ad es. CCM.

15 È quindi anche un oggetto dell'invenzione l'uso di almeno un peptide isolato che consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità di almeno il 95%, preferibilmente del 100%, con una sequenza amminoacidica scelta fra SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, e SEQ ID NO. 5 come biomarcatore per predire l'insorgenza del cancro delle cellule di Merkel (CCM) associato al virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV).

20 E' un ulteriore oggetto dell'invenzione un metodo di screening di un soggetto, preferibilmente un soggetto a rischio di sviluppare un cancro, per predire l'insorgenza del cancro delle cellule di Merkel (CCM) comprendente almeno un passaggio a) di porre un campione di un fluido biologico isolato da detto soggetto a contatto con almeno un peptide isolato che consiste di una sequenza amminoacidica
25 avente una identità di almeno il 95% con una sequenza amminoacidica scelta fra SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, e SEQ ID NO. 5. Detto metodo comprende preferibilmente un ulteriore passaggio b) di rilevazione di un immunocomplesso fra almeno un anticorpo contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) e almeno un peptide del punto (a), dove la rilevazione di detto immunocomplesso è indicativa della possibile insorgenza del cancro delle cellule di Merkel (CCM) in detto soggetto.

30 I peptidi dell'invenzione possono essere ottenuti mediante le comuni metodiche di sintesi di peptidi note nel settore. In una forma di realizzazione un peptide sintetico può essere ottenuto per mezzo di processi di sintesi.

In una realizzazione esemplificativa della presente invenzione, la rilevazione di anticorpi contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV in un campione isolato di siero umano avviene mediante un saggio immunologico ELISA indiretto, che comprende le seguenti fasi:

- 1) Una fase di preparazione di almeno un peptide e coating;
- 2) Una fase di blocking;
- 3) Una fase di aggiunta di anticorpi primari;
- 4) Una fase di aggiunta di anticorpo secondario;
- 5) Una fase di rilevazione e lettura allo spettrofotometro; e
- 6) Una fase di calcolo del valore soglia (cut off).

Tutti detti passaggi possono essere eseguiti secondo le comuni conoscenze nel settore. Si può fare ad esempio riferimento ai lavori [2-4].

Ad esempio, nella fase (1) almeno un peptide liofilizzato scelto fra LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3 viene disciolto e successivamente viene fatto aderire (coating) in un corrispondente pozzetto di una piastra da 96 pozzetti. Dopo un periodo di incubazione i peptidi in eccesso che non hanno aderito alle pareti dei pozzetti vengono rimossi.

Ad esempio, nella fase (2) ad ogni pozzetto della piastra da 96 pozzetti viene aggiunto un reagente "Blocking Solution" in modo di evitare che un anticorpo primario eventualmente presente nei campioni di siero interagisca con la superficie del pozzetto. "Blocking solution" sono note nel settore.

Ad esempio, nella fase (3) ad ogni pozzetto contenente uno specifico peptide viene aggiunto un campione di siero da analizzare, in modo da evidenziare l'eventuale presenza di anticorpi circolanti contro le proteine oncogene LT ed sT di MCPyV. Viene incluso anche almeno un controllo positivo, e almeno un controllo negativo costituiti da sieri appartenenti a pazienti affetti da carcinoma delle cellule di Merkel (CCM), risultati rispettivamente in precedenza: (i) positivi agli anticorpi IgG contro le proteine oncogene LT/sT di MCPyV; (ii) negativi agli anticorpi IgG contro le proteine oncogene LT/sT di MCPyV. Ciascun campione di siero può essere testato in doppio ed in tre replicati sperimentali.

Ad esempio, nella fase (4) dopo aver rimosso l'anticorpo primario in eccesso, in ogni pozzetto viene aggiunto un anticorpo secondario, ad esempio un anticorpo di capra anti-uomo coniugato con perossidasi.

Ad esempio, nella fase (5) dopo aver rimosso l'anticorpo secondario in eccesso, in ciascun pozzetto viene aggiunto un reagente che permette la lettura allo spettrofotometro, ad esempio 2,2'-Azino-bis-

3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, (ABTS), per quantificare il livello di anticorpi eventualmente presenti nei campioni di siero. I valori di densità ottica (OD) ottenuti dopo la lettura vengono poi analizzati.

Ad esempio, nella fase (6) il valore soglia (cut off) viene calcolato attraverso la media dei valori delle OD di tre campioni di controllo negativi, a cui viene sommata la deviazione standard addizionata tre volte. Ad esempio, un campione di siero viene considerato positivo agli anticorpi contro la proteina LT di MCPyV se contemporaneamente positivo ad almeno due peptidi LT-1, LT-2 e LT-4 su tre, cioè quando i valori delle OD sono superiori ai valori di cut-off dei singoli esperimenti. Similmente, un campione di siero viene considerato positivo agli anticorpi contro la proteina sT di MCPyV se contemporaneamente positivo ai peptidi sT-1 e sT-3.

L'invenzione verrà ora illustrata con l'ausilio di esempi.

ESEMPI

MATERIALI E METODI

Campioni biologici

Per lo studio sono stati raccolti i seguenti campioni di siero appartenenti a pazienti affetti da carcinoma delle cellule di Merkel (CCM), risultati in precedenza (i) positivi agli anticorpi IgG contro le proteine oncogene LT/sT di MCPyV (n=128, età media \pm deviazione standard [DS], $75 \pm [9]$ anni); (ii) negativi agli anticorpi IgG contro le proteine oncogene LT/sT di MCPyV (n=137, età media \pm [DS], $60 \pm [8]$ anni) con un test immunologico considerato come gold standard [1]. I sieri sono stati forniti da Cliniche Universitarie e Centri di Ricerca, dopo aver firmato il consenso informato in conformità con la Dichiarazione di Helsinki. E' stato raccolto l'espresso consenso, libero e informato, a tale prelievo e utilizzazione della persona da cui è stato prelevato tale materiale, in base alla normativa vigente.

Le proteine oncogene dei virus polioma, verso le quali vengono prodotti gli anticorpi, sono codificate dalla regione denominata precoce del genoma virale. I peptidi lineari qui riportati sono stati sintetizzati utilizzando tecniche e apparecchiature standard [2–4]. La serie di peptidi utilizzati come antigeni specifici del virus MCPyV, nel saggio ELISA indiretto per rilevare nei sieri gli anticorpi contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV, sono:

Peptide LT-1, 21 amminoacidi, con la seguente sequenza (da N-terminale NH₂ a C-terminale COOH):

KFKEWWRSGGFSFGKAYEYGP (SEQ ID NO. 1)

Peptide LT-2, 21 amminoacidi, con la seguente sequenza:

ASRGAPSGSSPPHSQSSSSGY (SEQ ID NO. 2)

Peptide LT-4, 20 amminoacidi, con la seguente sequenza:

GTWEDLFCDESLSSPEPPSS (SEQ ID NO. 3)

Peptide sT-1, 19 amminoacidi, con la seguente sequenza:

5 QSGYNARFCRGP GCMLKQL (SEQ ID NO. 4)

Peptide sT-3, 19 amminoacidi, con la seguente sequenza:

SKCACISCKLSRQHCSLKT (SEQ ID NO. 5)

Questi peptidi LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3 sono derivati dalle sequenze amminoacidiche delle proteine oncogene LT e sT di MCPyV.

10 **Identificazione di anticorpi contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV nei sieri umani mediante il saggio immunologico ELISA indiretto**

Il test è suddiviso in diverse fasi come precedentemente riportato [2–4]:

1. Fase di preparazione dei peptidi e coating. Durante questa prima fase i peptidi liofilizzati LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3 vengono disciolti in Coating Buffer 1X (Candor Bioscienze GmbH – CABRU s.a.s. Milano) per avere una concentrazione finale di 100 µg/mL. Vengono poi eseguite delle aliquote dei peptidi disciolti, le quali vengono conservate a - 20°C. I peptidi sintetici vengono quindi successivamente fatti aderire (coating) ai pozzetti di una piastra da 96 pozzetti. Un volume di 100 µL di ciascun peptide, diluito 1:2 in Coating Buffer 1X, in modo da ottenere una concentrazione finale di 50 µg/mL, viene aggiunto tramite pipetta multicanale in ogni pozzetto della piastra da 96 pozzetti. Ciascun specifico peptide viene inserito in un corrispondente pozzetto. Per permettere ai peptidi di aderire alle pareti dei pozzetti, la piastra viene incubata al buio a 4°C per 16-18 ore. Alla fine del periodo di incubazione, si effettuano tre lavaggi con 250 µL di Washing Buffer 10X (Candor Bioscience GmbH - CABRU s.a.s. Milano) per ogni pozzetto, precedentemente diluito 0.5X con acqua bidistillata. Questa fase viene effettuata allo scopo di rimuovere i peptidi in eccesso che non hanno aderito alle pareti dei pozzetti. I lavaggi vengono realizzati utilizzando uno strumento denominato washer (Thermo Electron Corporation, Wellwash 4 MK 2, Pobbiano, Italia).
2. Fase di blocking. In questa seconda fase, tramite pipetta multicanale vengono aggiunti 200 µl di Blocking Solution (Candor Bioscience GmbH – CABRU s.a.s. Milano) ad ogni pozzetto della piastra da 96 pozzetti così da evitare che rimangano aree del pozzetto non coperte dal peptide. In questo modo si ottiene la saturazione dei pozzetti e si evita che l'anticorpo primario eventualmente presente nei campioni di siero interagisca con la superficie del pozzetto. Dopo l'aggiunta della Blocking

Solution, la piastra viene fatta incubare al buio a 37°C per 90 minuti. Come ultima fase, vengono effettuati tre lavaggi con Washing Buffer (250 uL per ogni pozzetto), diluito 0.5X, utilizzando lo strumento washer.

3. Aggiunta degli anticorpi primari. A questo punto è possibile aggiungere ai rispettivi pozzetti i
5 campioni di siero da analizzare, in modo da evidenziare l'eventuale presenza di anticorpi circolanti contro le proteine oncogene LT ed sT di MCPyV. Per ogni esperimento vengono testati anche dei campioni di controllo costituiti da sieri appartenenti a pazienti affetti da carcinoma delle cellule di Merkel (CCM), risultati in precedenza (i) positivi agli anticorpi IgG contro le proteine oncogene LT/sT di MCPyV; (ii) negativi agli anticorpi IgG contro le proteine oncogene LT/sT di MCPyV. In
10 ogni pozzetto vengono quindi aggiunti 100 µL di siero, precedentemente diluiti 1:20 in Low Cross Buffer (Candor Bioscience GmbH - CABRU s.a.s. Milano, Italia); ogni campione di siero viene testato in doppio ed in tre replicati sperimentali da operatori differenti. Dopo l'aggiunta dei campioni di siero, la piastra viene incubata al buio a 37°C per 90 minuti.
4. Aggiunta dell'anticorpo secondario. Per rimuovere il siero in eccesso in ogni pozzetto, vengono
15 effettuati tre lavaggi con 250 µL di washing buffer diluito 0.5X. Utilizzando una pipetta multicanale, in ogni pozzetto vengono successivamente aggiunti 100 µL di anticorpo secondario di capra anti-uomo coniugato con perossidasi (CalbioChem, Milano), precedentemente diluito 1:10.000 in Low Cross Buffer. La piastra viene poi fatta incubare al buio a temperatura ambiente per 90 minuti.
5. Rilevazione e lettura allo spettrofotometro. Allo scopo di rimuovere l'anticorpo secondario in
20 eccesso, si effettuano tre lavaggi con 250 µL di Washing Buffer diluito 0.5X per ogni pozzetto. Utilizzando una pipetta multicanale, vengono aggiunti in ogni pozzetto 100 µL di 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS; Sigma, Milano). La piastra viene lasciata incubare al buio a temperatura ambiente per 45 minuti. L'aggiunta del reagente ABTS permetterà la lettura allo spettrofotometro (Thermo Electron Corporation, Wellwash 4 MK 2. Pobbiano, Italia) ad una
25 lunghezza d'onda di 405 nm, con lo scopo di quantificare il livello di anticorpi eventualmente presenti nei campioni di siero. I valori di densità ottica (OD) ottenuti dopo la lettura vengono poi analizzati: i valori dei duplicati nella stessa piastra, così come i replicati sperimentali, devono essere paragonabili tra loro.
6. Calcolo del valore soglia (cut off). Il valore soglia (cut off) viene calcolato per ogni esperimento e a
30 seconda del peptide utilizzato. In particolare, il valore cut off viene calcolato attraverso la media dei valori delle OD di tre campioni di controllo negativi, a cui viene sommata la deviazione standard addizionata tre volte. Un campione di siero viene considerato positivo agli anticorpi contro la proteina LT di MCPyV se contemporaneamente positivo ad almeno due peptidi LT-1, LT-2 e LT-4 su tre, cioè

quando i valori delle OD sono superiori ai valori di cut-off dei singoli esperimenti. Similmente, un campione di siero viene considerato positivo agli anticorpi contro la proteina sT di MCPyV se contemporaneamente positivo ai peptidi sT-1 e sT-3. Questa procedura di calcolo è in linea con esperimenti effettuati in precedenza e anche con la letteratura internazionale che riguarda l'argomento [3–6].

RISULTATI

Esempio 1

Analisi Computazionali

Analisi di sequenza

Nel presente studio è stato sviluppato e validato un nuovo metodo immunologico per determinare la presenza di anticorpi sierici contro gli antigeni LT e sT di MCPyV. Il saggio è basato sull'impiego di brevi sequenze lineari peptidiche sintetiche uniche di MCPyV, definite mimotopi, che rappresentano antigeni/epitopi specifici e bersagli immunologici per gli anticorpi sierici umani. Ad oggi, non sono disponibili metodi rapidi e specifici, che utilizzino tecniche immunologiche per verificare inequivocabilmente la presenza di anticorpi contro gli antigeni LT e sT di MCPyV nell'uomo.

In particolare, cinque nuovi peptidi sintetici lineari, denominati LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3, che mimano rispettivamente gli epitopi delle proteine oncogene LT e sT di MCPyV, sono stati disegnati e impiegati nei test immunologici come mimotopi per rilevare gli anticorpi IgG anti-MCPyV.

In una prima fase, è stata valutata l'identità tra i residui amminoacidici (a.a.) dei cinque peptidi in oggetto e le corrispondenti sequenze delle proteine LT e sT dei ceppi nativi dei poliomavirus (PyV) isolati dai 16 PyV umani/di scimmie noti, compreso MCPyV e le sue centinaia di sequenze di LT (n=229) e sT (n=70) note. Le analisi computazionali sono state eseguite tramite il software DNASTAR (Lasergene, Madison, Stati Uniti) [2]. Le sequenze a.a. dei peptidi LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3 sono risultate essere altamente concordanti con le sequenze amminoacidiche delle proteine LT ed sT di MCPyV. In particolare, la sequenza a.a. del peptide LT-1 è risultata essere identica al 100% a quella corrispondente della proteina LT dei 229 ceppi isolati di MCPyV, inclusi i ceppi nordamericani (MCC350 o EU375803.1 e MCC339 o EU375804.1), giapponesi (TKS e FJ464337), europei (MKL-1 o FJ173815) e cinesi (HB039C o KC571692.1). Inoltre, la sequenza a.a. del peptide LT-2 era identica al 100% a quella della corrispondente LT di 226 ceppi isolati di MCPyV, inclusi i ceppi principali di MCPyV sopra menzionati, pur essendo concordante al 95.2% (20/21 a.a.) con quella di seguenti ceppi di MCPyV isolati A0A0D3LRX9, X5FLV8 e E2GHQ3. Inoltre, la sequenza a.a. del peptide LT-4 era concordante al 100% con la sequenza corrispondente della proteina LT di

227 ceppi isolati di MCPyV, inclusi i ceppi principali di MCPyV sopra menzionati, e al 95% (19/20 a.a.) concordante con quella dei ceppi di MCPyV A0A0D3LRZ4 e G8FSZ3. Per quanto riguarda sT-1 e sT-3, le loro sequenze a.a. erano identiche al 100% a quella degli sT di tutti i 70 ceppi MCPyV attualmente noti. In pochi casi, per tutti i peptidi LT/sT, l'identità con i ceppi nativi LT e sT degli altri 15 PyV era compresa tra il 55% ed il 32%, pur essendo inferiore al 32% nella maggior parte dei casi. Inoltre, i peptidi LT e sT differiscono anche dai ceppi nativi LT e sT dei 15 diversi PyV, a causa della presenza sporadica (o assenza) di a.a. all'interno della loro sequenza amminoacidica.

Analisi conformazionali tridimensionali

Sono state eseguite ulteriori analisi computazionali per valutare la posizione e struttura secondaria dei peptidi nel contesto delle proteine LT e sT. Le analisi computazionali sono state eseguite tramite il software DNASTAR (Lasergene, Madison, Stati Uniti) [2]. I peptidi LT-1, LT-2 e LT-4 corrispondono agli a.a. 89-109, a.a. 125-145 e a.a. 207-226, rispettivamente, del ceppo di riferimento MCPyV LT B6D VW7_9POLY LT. I peptidi sT-1 e sT-3 sono localizzati negli a.a. 96-114 e 117-135 del ceppo di riferimento MCPyV sT B0G0V7_9POLY. Le strutture terziarie delle proteine LT e sT di MCPyV sono state predette in modo computazionale utilizzando il software DNASTAR. Le sequenze a.a. dei peptidi LT-1, LT-2, LT-4 e sT-1, sT-3 sono caratterizzate dalla formazione di strutture secondarie stabili. Infatti, tutti i peptidi LT e sT mostrano diversi domini random coil. Inoltre, il peptide sT-3 forma una struttura secondaria stabile dall' a.a. 122 all'a.a. 135, cioè 122ISCKLSRQHCSLKT135, dove si trova un dominio ad alfa elica, circondato da due strutture secondarie a random coil (**Fig. 1**). La rappresentazione grafica tridimensionale dei peptidi LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3 mappati rispettivamente sulle strutture native predette di LT e sT di MCPyV, indicava che queste regioni sono esposte esternamente sulle superfici proteiche, o comunque in regioni potenzialmente accessibili agli anticorpi e conseguentemente potenzialmente immunogeniche (epitopi) (**Fig. 1**).

Studio dei siti immunogenici

Per valutare se i peptidi selezionati possono rappresentare siti immunogenici naturali, abbiamo predetto gli epitopi CTL HLA-A1, HLA-A2, HLA-A*0201 e HLA-A*0205 derivati dagli antigeni LT e sT utilizzando due specifici software denominati ProPred-I e NetCTL-1.2 [18, 19]. La sequenza a.a. della proteina MCPyV LT ottenuta dal database UniProt (numero di accesso: B6D VW7_9POLY) lunga 817 a.a., è stata scaricata in formato FASTA per eseguire le analisi computazionali descritte in seguito. Tutti i peptidi LT, cioè LT-1, LT-2, LT-4, sono risultati avere siti di legame putativi per gli MHC di classe I con entrambi i software. Nello specifico, le regioni corrispondenti agli a.a. 95-107, 137-145 e 207-212 di LT, in cui sono localizzati rispettivamente i peptidi LT-1, LT-2 e LT-3, sono

risultati essere siti immunogenici (epitopi) per gli HLA-A1 sia per ProPred-I che per NetCTL-1.2. Inoltre, il software Net-CTL-1.2. ha indicato come epitopo la sequenza corrispondente agli a.a. 140-145 di LT, in cui si trova il peptide LT-2. La sequenza a.a. della proteina MCPyV sT ricavata da UniProt (numero di accesso: B0G0V7_9POLY), lunga 186 a.a., è stata scaricata ed analizzata per valutare la presenza di eventuali epitopi. Le analisi effettuate utilizzando i due strumenti informatici ProPred-I e NeTCTL-1.2., hanno determinato la stessa sequenza immunogenica per gli HLA-A1 corrispondente agli a.a. 96-99 della proteina sT, in cui si trova il peptide sT-1. Per il peptide sT-3, il software ProPred-I ha rilevato la presenza di siti immunogenici. In particolare, i siti corrispondenti agli a.a. 117-120 e 125-135 della proteina sT, sono risultati epitopi per gli HLA-A2, HLA-A*0201 e HLA-A*0205. Questi risultati computazionali hanno suggerito che le sequenze a.a. selezionate per i peptidi LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3 possono quindi rappresentare brevi siti naturali di legame per gli anticorpi IgG, e probabilmente anche per altre classi di Ig, contro antigeni sia lineari che conformazionali.

Esempio 2

15 Valutazione dei parametri di prestazione dei peptidi nel rilevamento degli anticorpi IgG sierici contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV

Nel saggio ELISA indiretto sono stati esaminati complessivamente n=265 campioni di siero. In particolare, sono stati raccolti campioni di siero appartenenti a pazienti affetti da carcinoma delle cellule di Merkel (CCM), risultati in precedenza (i) positivi agli anticorpi IgG contro le proteine oncogene LT/sT di MCPyV (n=128, età media \pm deviazione standard [DS], $75 \pm [9]$ anni); (ii) negativi agli anticorpi IgG contro le proteine oncogene LT/sT di MCPyV (n=137, età media \pm [DS], $60 \pm [8]$ anni). I criteri valutati per ciascun peptide, calcolati confrontando i risultati attesi e ottenuti, sono mostrati nelle Tabelle 1 e 2. Secondo una procedura standard precedentemente riportata [2], per il computo dei criteri sono state considerate le seguenti condizioni dei campioni: veri positivi (TP, il numero di campioni positivi secondo le analisi precedenti), falsi positivi (FP, il numero di campioni positivi con il nostro test e negativi con le analisi precedenti), veri negativi (TN, il numero di campioni negativi secondo le analisi precedenti) e falsi negativi (FN, il numero di campioni negativi con il nostro test e positivi con le analisi precedenti). Le prestazioni del test sono state quindi valutate calcolando i seguenti criteri: sensibilità [Se, $TP/(TP+FN)$], specificità [Sp, $TN/(TN+FP)$], precisione [$(TP+TN)/(TP+TN+FP+FN)$], valore predittivo positivo [VPP, $TP/(TP+FP)$], valore predittivo negativo [VPN, $TN/(TN+FN)$], validità [come $(Se+Sp)/2$], accuratezza [$Se*Prevalenza+Sp*(1-Prevalenza)$]. L'accuratezza dei peptidi è stata valutata considerando le seguenti misure combinate: indice di Youden (J, $Se+Sp-1$), rapporto di verosimiglianza positivo [LR+, come $Se/(1-Sp)$], rapporto

di verosimiglianza negativo [LR-, (1 -Se)/Sp] [2]. Inoltre, il coefficiente kappa di Cohen (κ) è stato calcolato per valutare la concordanza tra i risultati attesi e quelli ottenuti. Il valore κ è stato interpretato come scarso ($\kappa \leq 0$), lieve ($0 < \kappa \leq 0,20$), discreto ($0,21 < \kappa \leq 0,40$), moderato ($0,41 < \kappa \leq 0,60$), sostanziale ($0,61 < \kappa \leq 0,80$) e quasi-perfetto ($0,81 < \kappa \leq 1,0$) [2].

- 5 **Tabella 1.** Parametri delle prestazioni del saggio immunologico per il rilevamento delle IgG contro la proteina oncogena LT del virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV).

	LT-1	LT-2	LT-4
Sensibilità (Se)	81.30% (73.4-87.6)	73.44% (64.9-80.9)	82.81% (75.1-88.9)
Specificità (Sp)	73.72% (65.5-80.8)	73.00% (75.0-80.2)	67.15% (62.0-74.9)
Precisione	77.35% (71.8-82.3)	73.21% (67.5-78.4)	74.72 % (69.0-79.8)
Rapporto di verosimiglianza (LR+)	3.09 (2.31-4.14)	2.72 (2.03-3.65)	2.52 (1.96-3.24)
Rapporto di verosimiglianza (LR-)	0.25 (0.18-0.37)	0.36 (0.27-0.49)	0.26 (0.17-0.38)
Valore predittivo positivo (VPP)	74.30% (68.3-79.5)	71.80% (65.4-77.3)	70.20% (64.7-75.2)
Valore predittivo negative (VPN)	80.80% (74.3-86.0)	74.63% (68.4-80.0)	80.70% (73.8-86.2)
Validità	77.50%	73.22%	75.00%
Indice di Youden (J)	0.55	0.46	0.50
Accuratezza	77.36%	73.20%	74.71%
Valore Kappa di Cohen (κ)	0.548	0.463	0.496

- 10 Criteri di prestazione diagnostica del saggio immunologico ottenuti testando sieri di controllo MCPyV-positivi (n=128) e - negativi (n=137). I numeri racchiusi tra parentesi per i parametri di sensibilità, specificità, accuratezza, LR+, LR-, PPV e NPV rappresentano l'intervallo di confidenza (CI) al 95%.

- 15 **Tabella 2.** Parametri delle prestazioni del saggio immunologico per il rilevamento delle IgG contro la proteina oncogena sT del virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV).

	sT-1	sT-3
Sensibilità (Se)	80.50% (72.5-86.9)	72.00% (63.3-79.7)
Specificità (Sp)	74.80% (66.3-82.0)	60.50% (51.1-69.3)
Precisione	77.65% (72,0-82.6)	66.40% (60.1-72.3)
Rapporto di verosimiglianza (LR+)	3.19 (2.34-4.36)	1.82 (1.42-2.34)
Rapporto di verosimiglianza (LR-)	0.26 (0.18-0.38)	0.46 (0.34-0.64)
Valore predittivo positivo (VPP)	76.30% (70.2-81.5)	65.70% (59.9-71.0)
Valore predittivo negativo (VPN)	79.17% (72.5-84.6)	67.30% (60.0-73.8)
Validità	77.64%	66.25%
Indice di Youden (J)	0.55	0.33
Accuratezza	77.70%	66.39%
Valore Kappa di Cohen (κ)	0.552	0.325

5 Criteri di prestazione diagnostica del saggio immunologico ottenuti testando sieri di controllo MCPyV-positivi (n=128) e -negativi (n=137). I numeri racchiusi tra parentesi per i parametri di sensibilità, specificità, accuratezza, LR+, LR-, PPV e NPV rappresentano l'intervallo di confidenza (CI) al 95%.

10 Il saggio immunologico ha dimostrato rispettivamente 81.3%, 73.44%, 82.81%, 80.5% e 72% di sensibilità per i peptidi LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3, i quali hanno inoltre dimostrato una specificità rispettivamente del 73.72%, 73%, 67.15%, 74.8% e 60.5%. Valori predittivi positivi (VPP) del 74.3%, 71.8%, 70.2%, 76.3% e 65.7% insieme a valori predittivi negativi (VPN) del 80.80%, 74.63%, 80.70%, 79.17% e 67.30%, sono stati rispettivamente calcolati per LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3. Allo stesso modo, i criteri di validità per LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3, sono risultati rispettivamente essere del 77.50%, 73.22%, 75.00%, 77.64% e 66.25%. È stata inoltre calcolata l'accuratezza dei peptidi LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3, risultando essere rispettivamente del 77.35%, 73.21%, 74.72%, 77.65% e 66.40%.

15

I valori ottenuti dei criteri sopramenzionati indicano che il saggio immunologico qui descritto è valido e accurato.

La valutazione dei parametri diagnostici ha anche indicato che l'indice di Youden (J), il rapporto di verosimiglianza positivo (LR+) e il rapporto di verosimiglianza negativo (LR-) erano rispettivamente 0.55, 3.09 e 0.25 per il peptide LT-1. Allo stesso modo, J, LR+ e LR- sono stati calcolati per LT-2 risultando rispettivamente 0.46, 2.72 e 0.36, mentre LT-3 ha riportato rispettivamente i valori 0.5, 2.52, 0.26 per gli stessi parametri. Similmente, i valori J, LR+ e LR- per sT-1 sono risultati rispettivamente 0.55, 3.19 e 0.26, mentre il peptide sT-3 ha mostrato 0.33, 1.82 e 0.46.

In sintesi, sono stati determinati valori di J, LR+ e LR- sufficienti per tutti i peptidi LT/sT.

In particolare, un valore J verso 1 esclude l'esistenza di falsi positivi/negativi, mentre maggiore (o minore) è il LR di un test positivo (o negativo), più attendibile è il risultato del saggio in fase di sviluppo. La concordanza tra i risultati attesi e quelli ottenuti è stata del 77.36%, con un valore Kappa di Cohen (κ) di 0.548 per LT-1, 73.20%, con un κ di 0.463 per LT-2 e, 74.71%, con un κ di 0.496 per LT-4. Similmente, l'sT-1 e l'sT-3 hanno mostrato rispettivamente una concordanza del 77.70% e del 66.39%, con un κ di 0.552 e 0.325.

La concordanza tra i risultati attesi/ottenuti si è rivelata essere inserita all'interno di un range di concordanza discreto/moderato. Questi valori indicano quindi una correlazione rilevante tra i risultati attesi e quelli ottenuti, sottolineando così che il nostro test raggiunge i prerequisiti sufficienti per il rilevamento degli anticorpi antivirali.

Successivamente, sono state computate le curve "receiver operating characteristic" (ROC) utilizzando le densità ottiche (OD) ottenute su sieri di controllo positivi e negativi per MCPyV, per i peptidi LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3. L'area sotto la curva (AUC) è risultata pari a 0.7 (95% CI: da 0.641 a 0.754), 0.597 (95% CI: da 0.535 a 0.656), 0.607 (95% CI: da 0.545 a 0.666), 0.631 (95% CI: da 0.569 a 0.690) e 0.509 (95% CI: da 0.444 a 0.573), rispettivamente per i peptidi LT-1, LT-2, LT-4, sT-1 e sT-3 (**Fig. 2**).

La differenza tra le AUC per i peptidi LT-1, LT-2, LT-4 e sT-1 è risultata essere statisticamente significativa rispetto a quella di un test senza valore (AUC=0.5, $p<0,01$) (**Fig. 2 A-D**). Le AUC dei peptidi LT-1, LT-2, LT-4 e sT-1 erano tutte comprese nell'intervallo di riferimento 0.6-0.7. L'AUC di sT-3, invece, è risultata essere simile a quella di un test senza valore (0.5, $p=0.8$) (**Fig. 2E**). Questi dati indicano che il dosaggio immunologico basato sui peptidi LT-1, LT-2, LT-4 e sT-1 è in grado di distinguere con molta efficienza sieri positivi e negativi.

I dati immunologici indicano che è stato messo a punto un test immunologico indiretto affidabile per la rilevazione di IgG sieriche contro le proteine oncogene LT ed sT di MCPyV nei sieri di controllo. Le analisi computazionali hanno indicato che i peptidi possono riconoscere in modo specifico le IgG generate contro le proteine oncogene LT e sT di MCPyV. Inoltre, i criteri di prestazione del test, tra cui sensibilità, accuratezza, specificità, affidabilità oltre che altri criteri, sono stati accuratamente valutati nei sieri di controllo MCPyV-positivi/-negativi e sono risultati essere adeguati.

BIBLIOGRAFIA

1. Rotondo, J.C.; Bononi, I.; Puozzo, A.; Govoni, M.; Foschi, V.; Lanza, G.; Gafa, R.; Gaboriaud, P.; Touzé, F.A.; Selvatici, R.; et al. Merkel cell carcinomas arising in autoimmune disease affected patients treated with biologic drugs including anti-TNF. *Clin. Cancer Res.* 2017, 23, 3929–3934.
2. Mazziotta, C.; Lanzillotti, C.; Torreggiani, E.; Oton-Gonzalez, L.; Iaquina, M.R.; Mazzoni, E.; Gaboriaud, P.; Touzé, A.; Silvagni, E.; Govoni, M.; et al. Serum antibodies against the oncogenic Merkel Cell Polyomavirus detected by an innovative immunological assay with mimotopes in healthy subjects. *Front. Immunol.* 2021, 12, 676627.
3. Mazziotta, C.; Lanzillotti, C.; Govoni, M.; Pelliello, G.; Mazoni, E.; Tognon, M.G.; Martini, F.; Rotondo, J.C. Decreased IgG antibody response to viral protein mimotopes of oncogenic Merkel cell polyomavirus in sera from healthy elderly subjects. *Front. Immunol.* 2021, In press.
4. Mazziotta, C.; Lanzillotti, C.; Govoni, M.; Falzoni, S.; Tramarin, M.L.; Mazzoni, E.; Tognon, | Mauro; Martini, F.; Rotondo, J.C. Immunological evidence of an early seroconversion to oncogenic Merkel cell polyomavirus in healthy children and young adults. *Immunology* 2022.
5. Mazziotta, C.; Pelliello, G.; Tognon, M.; Martini, F.; Rotondo, J.C. Significantly low levels of IgG antibodies against oncogenic Merkel cell polyomavirus in sera from females affected by spontaneous abortion. *Front. Microbiol.* 2021, 12, 789991.
6. Saraswati, K.; Phanichkrivalkosil, M.; Day, N.P.J.; Blacksell, S.D. The validity of diagnostic cut-offs for commercial and in-house scrub typhus IgM and IgG ELISAs: A review of the evidence. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2019, 13, e0007158.
7. Touzé, A.; Gaitan, J.; Arnold, F.; Cazal, R.; Fleury, M.J.; Combelas, N.; Sizaret, P.Y.; Guyetant, S.; Maruani, A.; Baay, M.; et al. Generation of Merkel cell polyomavirus (MCV)- like particles and their application to detection of MCV antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 48, 1767–1770.
8. Boldorini, R.; Allegrini, S.; Tognon, M.; Miglio, U.; Rossi, D.; Pawlita, M.; Viscidi, R. Merkel cell carcinoma arising in inguinal lymph node in a patient with von Willebrand disease after multiple blood transfusions. *J. Clin. Virol.* 2014, 60, 73–75.

9. Mazziotta, C.; Christian, J.; Cervellera, F.; Lanzillotti, C.; Touzé, A.; Gaboriaud, P.; Tognon, M.; Martini, F.; Rotondo, J.C. MicroRNA dysregulations in Merkel cell carcinoma: Molecular mechanisms and clinical applications. *J. Med. Virol.* 2023, 95, e28375.
10. Li, J.; Wang, X.; Diaz, J.; Tsang, S.H.; Buck, C.B.; You, J. Merkel Cell Polyomavirus Large T Antigen Disrupts Host Genomic Integrity and Inhibits Cellular Proliferation. *J. Virol.* 2013, 87, 9173–9188.
11. Mazziotta, C.; Lanzillotti, C.; Gafà, R.; Touzé, A.; Durand, M.-A.; Martini, F.; Rotondo, J.C. The role of histone post-translational modifications in Merkel cell carcinoma. *Front. Oncol.* 2022, 0, 578.
12. Rotondo, J.C.; Mazziotta, C.; Lanzillotti, C.; Tognon, M.; Martini, F. Epigenetic Dysregulations in Merkel Cell Polyomavirus-Driven Merkel Cell Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 11464.
13. Nakamura, M.; Morita, A. Immune activity in Merkel cell carcinoma. *J. Dermatol.* 2022, 49, 68–74.
14. Mazzoni, E.; Rotondo, J.C.; Marracino, L.; Selvatici, R.; Bononi, I.; Torreggiani, E.; Touzé, A.; Martini, F.; Tognon, M.G. Detection of Merkel cell polyomavirus DNA in serum samples of healthy blood donors. *Front. Oncol.* 2017, 7, 294.
15. Tagliapietra, A.; Rotondo, J.C.J.C.; Bononi, I.; Mazzoni, E.; Magagnoli, F.; Gonzalez, L.O.; Contini, C.; Vesce, F.; Tognon, M.; Martini, F. Droplet-digital PCR assay to detect Merkel cell polyomavirus sequences in chorionic villi from spontaneous abortion affected females. *J. Cell. Physiol.* 2020, 34, 1888–1894.
16. Calvignac-Spencer, S.; Feltkamp, M.C.W.; Daugherty, M.D.; Moens, U.; Ramqvist, T.; Johne, R.; Ehlers, B. A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Arch. Virol.* 2016, 161, 1739–50.
17. Waterboer, T.; Sehr, P.; Michael, K.M.; Franceschi, S.; Nieland, J.D.; Joos, T.O.; Templin, M.F.; Pawlita, M. Multiplex Human Papillomavirus Serology Based on In Situ–Purified Glutathione S-Transferase Fusion Proteins. *Clin. Chem.* 2005, 51, 1845–1853.
18. Singh, H.; Raghava, G.P.S. ProPred1: prediction of promiscuous MHC Class-I binding sites. *BMC Bioinformatics.* 2003, 22, 1009-1014.
19. Larsen, M.V.; Lundegaard, C.; Lamberth, K.; Buus, S.; Lund, O.; Nielsen, M. Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. *BMC Bioinformatics.* 2007, 8, 424.

RIVENDICAZIONI

1. Un peptide isolato corrispondente ad almeno un epitopo degli antigeni T grande (LT) e/o T piccolo (sT) del virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV), che consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità di almeno il 95% con una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo che consiste di:

Peptide LT-1: KFKEWWRS GGFSFGKAYEYGP (SEQ ID NO. 1);

Peptide LT-2: ASRGAPSGSSPPHSQSSSSGY (SEQ ID NO. 2);

Peptide LT-4: GTWEDLFCDESLSSPEPPSS (SEQ ID NO. 3);

Peptide sT-1: QSGYNARFCRGP GCMLKQL (SEQ ID NO. 4); e

Peptide sT-3: SKCACISCKLSRQHCSLKT (SEQ ID NO. 5).

2. Il peptide isolato secondo la rivendicazione 1, che consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità del 100% con una sequenza amminoacidica scelta tra:

Peptide LT-1: KFKEWWRS GGFSFGKAYEYGP (SEQ ID NO. 1);

Peptide LT-2: ASRGAPSGSSPPHSQSSSSGY (SEQ ID NO. 2);

Peptide LT-4: GTWEDLFCDESLSSPEPPSS (SEQ ID NO. 3);

Peptide sT-1: QSGYNARFCRGP GCMLKQL (SEQ ID NO. 4); e

Peptide sT-3: SKCACISCKLSRQHCSLKT (SEQ ID NO. 5).

3. Una composizione comprendente due o più peptidi secondo le rivendicazioni 1 o 2, preferibilmente comprendente almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 1, almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 2, almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 3, almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 4, e almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 5.

4. Un metodo per il rilevamento di anticorpi contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) in un campione isolato di un fluido biologico comprendente almeno le fasi di:

- (a) porre detto campione isolato di un fluido biologico a contatto con almeno un peptide isolato che consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità di almeno il 95% con una sequenza amminoacidica scelta fra SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ

ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, e SEQ ID NO. 5;

(b) rilevare la formazione di almeno un immunocomplesso fra almeno un anticorpo contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) e detto almeno un peptide del passaggio (a), in cui la formazione dell'immunocomplesso è indicativa della presenza di almeno un anticorpo contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) nel campione isolato.

5
5. Il metodo secondo la rivendicazione 4 in cui detto almeno un peptide isolato consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità del 100% con una sequenza amminoacidica scelta fra SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, e SEQ ID NO. 5

10
6. Il metodo secondo la rivendicazione 4 o 5 in cui nel passaggio a) detto campione isolato è posto a contatto con la composizione della rivendicazione 3, preferibilmente con almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 1, almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 2, almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 3, almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 4, e almeno un peptide che consiste della sequenza amminoacidica con SEQ ID NO. 5.

15
7. Il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 4-6, in cui detti anticorpi contro MCPyV sono anticorpi IgG.

20
8. Il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 4-7, in cui la rilevazione di un immunocomplesso nella fase b) avviene tramite utilizzo di un anticorpo secondario anti-uomo.

25
9. Il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 4-8, in cui detto fluido biologico è scelto da un gruppo comprendente siero, plasma, sangue, saliva, urina e liquido cerebrospinale, preferibilmente è siero.

10. Il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 4-9, in cui la formazione di un immunocomplesso viene rilevata mediante un immunosaggio, preferibilmente ELISA indiretto.

30
11. Il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 4-10 in cui detto campione isolato di fluido biologico viene considerato positivo agli anticorpi contro la proteina LT di MCPyV se viene rivelata la formazione di almeno un immunocomplesso fra un anticorpo contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) e almeno due peptidi scelti fra SEQ ID

NO. 1 (LT-1), SEQ ID NO. 2 (LT-2) e SEQ ID NO. 3 (LT-4).

12. Il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 4-10 in cui detto campione isolato di fluido biologico viene considerato positivo agli anticorpi contro la proteina sT di MCPyV se viene rivelata la formazione di almeno un immunocomplesso fra un anticorpo contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) e entrambi i peptidi con SEQ ID NO. 4 (sT-1), e SEQ ID NO. 5 (sT-3).

13. Il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 4-12 in cui detto fluido biologico è isolato da un soggetto umano.

14. Il metodo secondo la rivendicazione 13, in cui detto campione isolato di un fluido biologico umano è precedentemente isolato da un soggetto scelto fra:

- (i) un paziente affetto da una o più patologie oncologiche, compreso il cancro,
- (ii) un paziente immunocompromesso o immunosoppresso, ad esempio un paziente che ha ricevuto un trapianto d'organo o affetto da AIDS o da una patologia immunodepressiva,
- (iii) un paziente affetto da una o più patologie, comprendente malattie autoimmuni, neurologiche e renali; e
- (iv) un individuo sano con o senza un rischio elevato d'insorgenza del carcinoma delle cellule di Merkel (CCM), ad esempio un soggetto anziano o un donatore di sangue, di cellule staminali e/o di organi.

15. Il metodo secondo la rivendicazione 14, in cui in (i) il cancro è carcinoma delle cellule di Merkel (CCM).

16. Il metodo secondo la rivendicazione 14 in cui il soggetto è affetto da una malattia autoimmune scelta fra artrite reumatoide, spondilite anchilosante e sclerosi multipla, preferibilmente in terapia con uno o più anticorpi monoclonali.

17. Kit diagnostico per la determinazione della presenza di anticorpi contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) in un campione isolato di un fluido biologico di un soggetto sospettato di essere infettato da MCPyV, comprendente almeno:

- (i) almeno un peptide isolato che consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità di almeno il 95% con una sequenza amminoacidica scelta fra SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, e SEQ ID NO. 5; e
- (ii) almeno un reagente per rilevare la formazione di un immunocomplesso fra un

anticorpo contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) e detto almeno un peptide in (i).

- 5 18. Il kit secondo la rivendicazione 17 in cui detto peptide isolato in (i) consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità del 100% con una sequenza amminoacidica scelta fra SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, e SEQ ID NO. 5.
19. Il kit diagnostico secondo la rivendicazione 17 o 18 in cui detto reagente in (ii) comprende un anticorpo secondario anti-uomo.
- 10 20. Il kit diagnostico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 17-19 comprendente una piastra ELISA come supporto solido di saggio.
21. Uso del kit diagnostico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 17-20, per rilevare la presenza di anticorpi contro MCPyV in un campione isolato di un fluido biologico, preferibilmente un fluido biologico umano.
- 15 22. Uso di almeno un peptide isolato che consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità di almeno il 95%, preferibilmente del 100%, con una sequenza amminoacidica scelta fra SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, e SEQ ID NO. 5 come biomarcatore per predire l'insorgenza del cancro delle cellule di Merkel (CCM) associato a virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV).
- 20 23. Un metodo di screening di un soggetto, preferibilmente un soggetto a rischio di sviluppare un cancro, per predire l'insorgenza del cancro delle cellule di Merkel (CCM) comprendente almeno un passaggio a) di porre un campione di un fluido biologico isolato da detto soggetto a contatto con almeno un peptide isolato che consiste di una sequenza amminoacidica avente una identità di almeno il 95% con una sequenza amminoacidica scelta fra SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, e SEQ ID NO. 5.
- 25 24. Il metodo secondo la rivendicazione 23 comprendente un ulteriore passaggio b) di rilevazione di un immunocomplesso fra almeno un anticorpo contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) e almeno un peptide del passaggio (a), dove la rilevazione di detto immunocomplesso è indicativa della possibile insorgenza del cancro delle cellule di
- 30 Merkel (CCM) in detto soggetto.

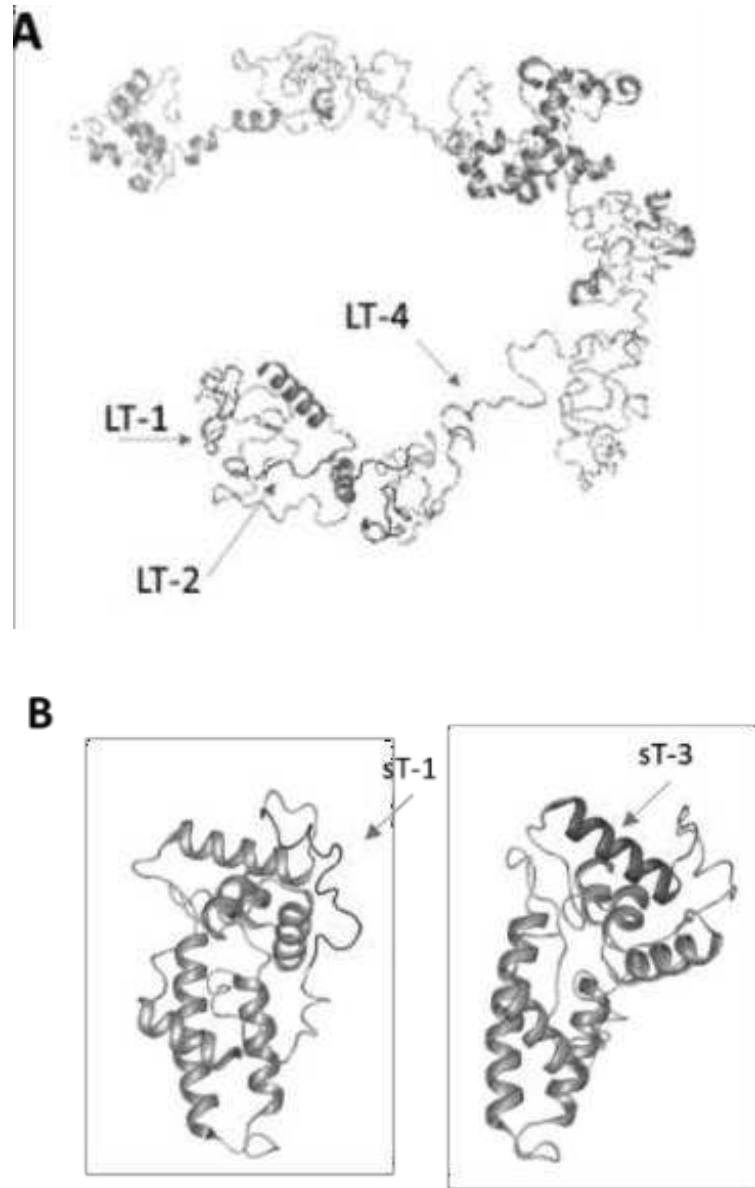


FIG. 1

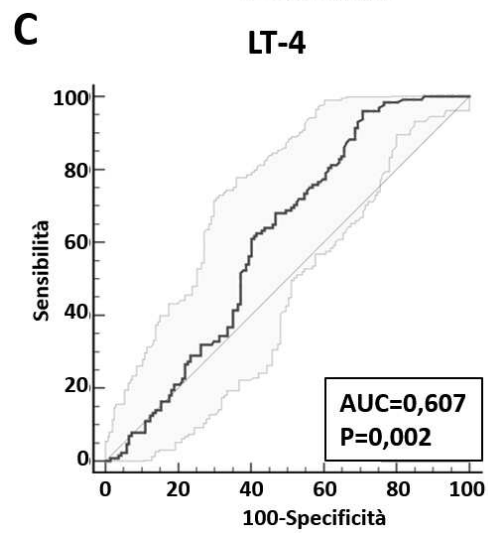
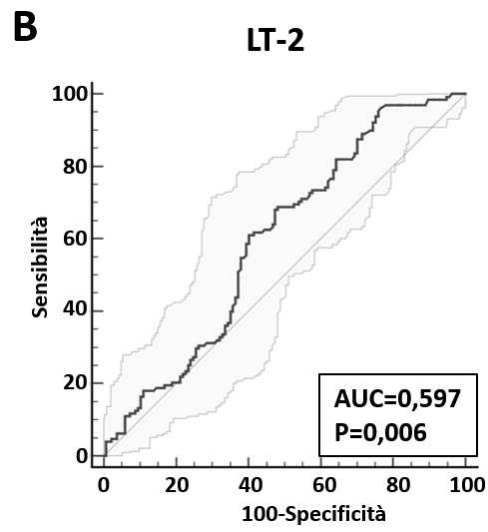
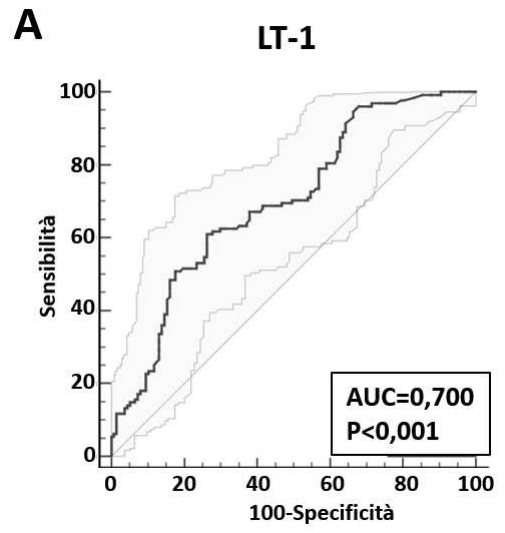
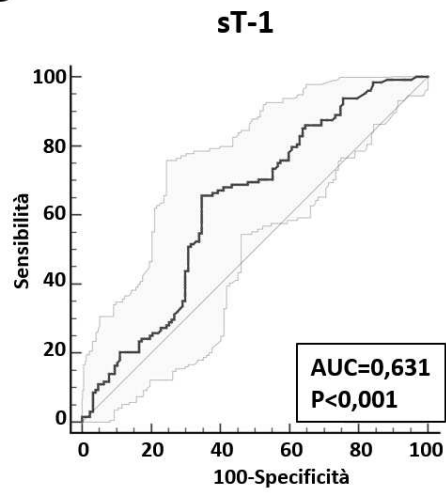


FIG. 2 (1/2)

D



E

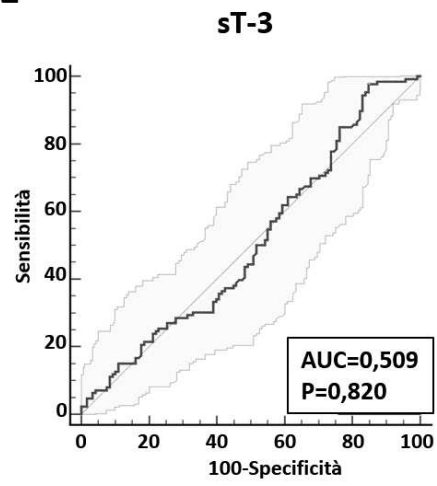


FIG. 2 (2/2)

AL MINISTERO DELLE IMPRESE E DEL MADE IN ITALY

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

OGGETTO: Deposito istanza di proroga per deposito della risposta al rapporto di
ricerca

Domanda di brevetto n. 102023000024003 del 13/11/2023

A nome: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FERRARA

Con riferimento all'oggetto, la sottoscritta dott. Luisa CURRADO della DE SIMONE & PARTNERS SRL, Via Giulio Caccini, 1 – 00198 Roma, chiede una proroga di due (2) mesi oltre il termine per la presentazione delle argomentazioni in risposta al rapporto di ricerca e l'opinione sulla brevettabilità della domanda in oggetto.

Roma, 22 maggio 2025

Con osservanza

Luisa Currado

DE SIMONE & PARTNERS SRL





Ministero delle Imprese e del Made in Italy

DIPARTIMENTO MERCATO E TUTELA
DIREZIONE GENERALE PER LA PROPRIETÀ INDUSTRIALE - UIBM

ATTESTATO DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

Il presente brevetto viene concesso per l'invenzione oggetto della domanda:

N. 102023000024003

TITOLARE/I: • UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FERRARA 100.0%

Ghirardi Valeria

DOMICILIO: De Simone & Partners S.p.A.
via V. Bellini 20
00198 Roma

INVENTORE/I: • Tognon Mauro
• Cervellera Christian Felice
• Tramarin Maria Letizia
• Mazziotta Chiara
• Rotondo John Charles
• Martini Fernanda
• Badiale Giada

TITOLO: PEPTIDI SINTETICI E LORO USO IN DIAGNOSTICA PER RILEVARE GLI ANTICORPI
CONTRO IL VIRUS POLIOMA DELLE CELLULE DI MERKEL (MCPYV)

CLASSIFICA: G01N

DATA DEPOSITO: 13/11/2023

Roma, 02/12/2025

Il Dirigente

Loredana Guglielmetti