



*Ministero dello Sviluppo Economico*

---

Ricevuta di presentazione

per

Brevetto per invenzione industriale

---

Domanda numero: 102020000021235

Data di presentazione: 08/09/2020

## DATI IDENTIFICATIVI DEL DEPOSITO

Ruolo	Mandatario
Depositante	paolo giuseppe domenico rambelli
Data di compilazione	08/09/2020
Riferimento depositante	(I0188839) BR UNI FERRARA
Titolo	Immunosaggio per l'identificazione di anticorpi contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) mediante l'uso di peptidi sintetici
Carattere domanda	Ordinaria
Esenzione	NO
Accessibilità al pubblico	NO
Numero rivendicazioni	12
Autorità depositaria	

## PRIVACY

Autorizzo il trattamento dei dati personali, inseriti all'interno del deposito, ai sensi del GDPR (Regolamento UE 2016/679) e del Decreto Legislativo 30 giugno 2003, n. 196 "Codice in materia di protezione dei dati personali"

## 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 Ariosto
Civico	35

CAP	44121
Telefono	
Fax	
Email	
Pec	
Quota percentuale	100.0%

## DOMICILIO ELETTIVO

Cognome/R.sociale	Jacobacci & Partners S.p.A.
Indirizzo	corso Emilia 8
Cap	10152
Nazione	Italia
Comune	Torino (TO)
Telefono	011 - 2440311
Fax	011 - 286300
Email\PEC	jp.uibm.msg@pec.jacobacci.com

## MANDATARI/RAPPRESENTANTI

Cognome	Nome
Rambelli	Paolo Giuseppe Domenico
Comoglio	Elena
Deambrogi	Edgardo

## INVENTORI

Cognome	Nome	Nazione residenza
MARTINI	Fernanda	Italia
ROTONDO	John Charles	Italia
MAZZONI	Elisa	Italia
TORREGGIANI	Elena	Italia

MAZZIOTTA	Chiara	Italia
LANZILLOTTI	Carmen	Italia
TOGNON	Mauro	Italia

## CLASSIFICAZIONI

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	01	N		

## NUMERO DOMANDE COLLEGATE

## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

Tipo documento	Riserva	Documento
Descrizione in italiano*	NO	EC 01 it UniFE _ Tognon MCPyV@I0188839 - DESCRIZIONE.pdf.p7m hash: 8641b13f6a19e0acf829fa1ef098c383
Lettera di Incarico	NO	Lettera_incarico_I0188839_signed.pdf.p7m hash: 7cf093e759eafe20c904d20014cc8632
Rivendicazioni in inglese	NO	EC 01 it UniFE _ Tognon MCPyV@I0188839 - RIV. in INGLESE.pdf.p7m hash: e48dd8719f74d43d8d59bb8690db3d1e
Rivendicazioni	NO	EC 01 it UniFE _ Tognon MCPyV@I0188839 - RIVENDICAZIONI.pdf.p7m hash: 099788b862add551af8a030ce03a1a3c
Riassunto	NO	EC 01 it UniFE _ Tognon MCPyV@I0188839 - RIASSUNTO.pdf.p7m hash: 0a2af950242c2d9460f6735d1ac11eff
Sequenza di nucleotidi o aminoacidi	NO	sequence_listing@I0188839.txt hash: a7908f684d9d980468821179cd707c77
Disegni	NO	EC 01 it UniFE _ Tognon MCPyV@I0188839 - FIGURA.pdf.p7m hash: 6dadfa50f2c6d1d9bc09bc432f102234

**PAGAMENTI**

<b>Tipo</b>	<b>Identificativo</b>	<b>Data</b>
Bollo	01192113546530	08/06/2020

**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:	€ 140,00
Importo Imposta Bollo:	€ 20,00

**NOTE**

### RIASSUNTO

Sono descritti un procedimento di saggio *in vitro* per la rilevazione di anticorpi diretti contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) in un campione di un fluido biologico di un soggetto sospettato di essere infettato da MCPyV, ed il relativo kit. Il procedimento e il kit dell'invenzione si basano sull'impiego come agente di cattura di uno o più peptidi isolati caratteristici del virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV), che non danno reazione crociata con altri virus Polioma.

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:  
"Immunosaggio per l'identificazione di anticorpi  
contro il virus polioma delle cellule di Merkel  
(MCPyV) mediante l'uso di peptidi sintetici"

Di: Università degli Studi di Ferrara, nazionalità  
italiana, Via Ariosto 35, 44121 Ferrara (Italia).

Inventori designati: MARTINI, Fernanda; ROTONDO,  
John Charles; MAZZONI, Elisa; TORREGGIANI, Elena;  
MAZZIOTTA, Chiara; LANZILLOTTI, Carmen; TOGNON,  
Mauro.

Depositata il: 08 settembre 2020

\* \* \*

#### DESCRIZIONE

La presente invenzione rientra nel settore  
dell'immunodiagnostica.

Più in particolare, la presente invenzione ri-  
guarda un saggio immunologico, preferibilmente del  
tipo ELISA indiretto, per l'identificazione della  
presenza di anticorpi contro il virus polioma delle  
cellule di Merkel (MCPyV) in un campione di fluido  
biologico di un soggetto preferibilmente umano.

Il virus polioma delle cellule di Merkel è uno  
dei 14 virus polioma umani ad oggi conosciuti  
(1,2). Il suo genoma è stato identificato, nel  
2008, integrato nel DNA cellulare di un carcinoma

delle cellule di Merkel (MCC), un raro tumore umano della pelle (3). MCPyV, come gli altri virus polio-  
ma umani, ad esempio BKPyV e JCPyV, è ubiquitario, cioè ampiamente diffuso nella popolazione umana (1,2). I virus polio-  
ma, in genere, non causano ma-  
lattie in soggetti sani e, sebbene diversi virus siano associati a malattie negli ospiti immunocom-  
promessi, MCPyV è l'unico direttamente associato al cancro (3). Infatti, MCPyV è stato classificato dalla WHO/IARC come probabilmente cancerogeno per l'uomo (gruppo 2A) (1,2)

Il carcinoma delle cellule di Merkel (MCC), sebbene sia un tumore raro della pelle è molto ag-  
gressivo. MCC presenta un alto tasso di mortalità, circa 46% in 5 anni (3). Ha un'incidenza di 1/~3 milioni di casi all'anno in Europa. Tale tumore è comune tra soggetti bianchi ed anziani (>60 anni) con un eccesso di esposizione ai raggi UV. Il virus oncogeno a DNA, MCPyV, è il suo agente eziologico. Infatti, il DNA di MCPyV è presente in circa l'80% di tutti i MCC (3). Anticorpi anti-MCPyV sono presenti in quasi il 100% di pazienti con MCC, nel 60-80% di adulti sani e nel 35% di bambini di 1-5 anni di età (4). Questi dati indicano che MCPyV è ubi-  
quitario. Il DNA di MCPyV è stato rilevato nello



strato leucocitario-piastrinico e in sieri di adulti sani con prevalenze del 22% e 2,6% indicando che MCPyV può replicarsi nei soggetti sani, riattivandosi dalla sua fase latente (5,6). Infatti, dopo l'infezione primaria che avviene in età pediatrica, MCPyV rimane latente in ospiti immunocompetenti, fino a quando un indebolimento del sistema immunitario porta alla riattivazione virale, integrazione del DNA virale nel genoma umano, con conseguente espressione permanente delle due oncoproteine virali, gli antigeni Large T (LT) e small T (ST). Similmente, è noto che una riattivazione e conseguente infezione dei virus polioma umani (3), inclusi JCPyV e BKPyV, può essere indotta da un deficit immunitario.

Negli ospiti immunocompromessi, il rischio d'insorgenza dell'MCC aumenta (7); infatti circa il 10% dei pazienti affetti da MCC mostra deficit immunitari. I pazienti immunosoppressi sono anche più inclini a sviluppare tumori virus-associati, tra cui il sarcoma di Kaposi e il linfoma di Burkitt, associati rispettivamente agli herpesvirus HHV8/KSHV e EBV.

Ai fini di ricerca scientifica, alcuni gruppi, compreso quello dei presenti inventori, hanno im-

piegato tecniche di biologia molecolare, come le metodiche della reazione a catena della polimerasi (PCR) sia qualitativa che quantitativa, per svelare la presenza di sequenze di DNA di MCPyV in campioni umani (7, 8). Tuttavia, attualmente non sono disponibili in commercio metodi specifici, rapidi, e poco costosi che utilizzino tecniche immunologiche per verificare la presenza di anticorpi contro MCPyV nell'uomo. Infatti, le attuali tecniche immunologiche riportate nella letteratura scientifica sono basate sull'utilizzo delle "virus-like particles" (VLPs), aggregati di VP1 ricombinante di MCPyV che si auto-assemblano *in vitro* (9). Le VLPs come antigene virale vengono impiegate per la ricerca di anticorpi anti-MCPyV. La produzione delle VLPs prevede diversi e laboriosi passaggi, tra cui la sintesi *in vitro* a partire da cellule di *Spodoptera frugiperda*, o altro batterio ricombinante, l'isolamento, la quantificazione ed infine l'impiego con test ELISA per verificare la presenza di anticorpi contro MCPyV (9, 10). Alternativamente, studi più recenti riportano lo sviluppo di metodi ELISA basati sul rilevamento multiplo di anticorpi denominato "Multiplex Serology" basato sull'impiego di microsfero fluorescenti, in combi-

nazione con la glutatione S-transferasi (GST). Tali sistemi, seppur innovativi poiché permettono il rilevamento contemporaneo di differenti virus, presentano varie limitazioni metodologiche in quanto sono basati comunque sull'impiego delle VLPs o proteine ricombinanti solubili (10, 11). Infatti, è importante far notare che l'utilizzo di proteine ricombinanti VLPs potrebbe far aumentare le probabilità di cross-reazione tra diversi virus che, seppur differenti, presentano un certo grado di omologia, e quindi inficiare il risultato ottenuto (9, 10, 11).

Visto l'attuale stato delle conoscenze, è evidente l'importanza di disporre di metodi di analisi standardizzati, specifici, sensibili, rapidi, e di basso costo che consentano di identificare in maniera inequivocabile la presenza di anticorpi contro MCPyV, sia nei sieri di pazienti affetti da patologie diverse, incluse le neoplasie come MCC, che in individui sani, per esempio donatori di sangue, di cellule staminali e di organi.

È inoltre di primario interesse la sorveglianza immunologica per MCPyV nei pazienti trattati con anticorpi monoclonali, come ad esempio i pazienti affetti da sclerosi multipla e da patologie autoim-

muni, quali artrite reumatoide e spondilite anchilosante (7). Infatti, dati pregressi dei presenti inventori indicano un aumento di incidenza del MCC di circa mille volte in pazienti affetti da patologie autoimmuni in terapia con farmaci biologici, anticorpi monoclonali. Per tale scopo, monitorare nel tempo i livelli anticorpali contro MCPyV nei sieri di tali pazienti, con un metodo standardizzato, sensibile, rapido, e di basso costo è di primaria importanza per garantirne un outcome favorevole (7).

Queste ed altre esigenze sono soddisfatte dalla presente invenzione, che mette a disposizione il procedimento immunologico e il relativo kit definiti nelle annesse rivendicazioni indipendenti, idonei per la rivelazione di anticorpi anti-MCPyV in un campione di un fluido biologico di un soggetto o paziente da analizzare.

Ulteriori caratteristiche dell'invenzione sono identificate nelle rivendicazioni dipendenti, che formano parte integrante della descrizione.

La presente invenzione consente di sopperire alla mancanza di metodiche analitiche immunologiche specifiche mediante l'impiego di una serie di nuovi peptidi sintetici, usati come antigeni virali in un

saggio immunologico, che consentono di svelare la presenza di anticorpi contro MCPyV. In particolare, gli inventori hanno identificato brevi sequenze peptidiche uniche in MCPyV, che rappresentano epitopi specifici e bersagli immunologici selettivi per gli anticorpi presenti nei sieri e altri fluidi di soggetti infettati da MCPyV.

Un primo oggetto della presente invenzione è quindi un peptide isolato, corrispondente a uno specifico epitopo o antigene di una proteina virale capsidica 1, 2 o 3 (VP1, VP2 e VP3) del virus pollioma delle cellule di Merkel (MCPyV), consistente nella sequenza amminoacidica scelta nel gruppo che consiste di SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2. Tale peptide isolato è caratteristico di MCPyV, nel senso che non dà reazione crociata con altri virus pollioma.

Un secondo oggetto della presente invenzione è un procedimento *in vitro* per la rivelazione di anticorpi anti-MCPyV in un campione di un fluido biologico di un soggetto, comprendente le fasi di:

- a) porre a contatto detto campione con un agente di cattura comprendente uno o più peptidi isolati di MCPyV come definiti in precedenza (i.e. SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2); e
- b) rilevare la formazione di un immunocomplesso fra

un anticorpo anti-MCPyV e il suddetto agente di cattura, in cui la formazione dell'immunocomplesso è indicativa della presenza di anticorpi anti-MCPyV nel campione di fluido biologico.

In una forma di realizzazione preferita, gli anticorpi anti-MCPyV eventualmente presenti nel campione di fluido biologico sono anticorpi IgG e/o IgM umani. In tal caso, la formazione dell'immunocomplesso è rivelata mediante l'impiego di un anticorpo secondario anti-uomo.

In un'altra forma di realizzazione preferita, il fluido biologico da analizzare è scelto dal gruppo che consiste di siero, plasma, sangue, saliva, urina, o liquido cefalorachidiano. Fra di essi è maggiormente preferito il siero.

In ancora un'altra forma di realizzazione preferita, la rilevazione dell'immunocomplesso è effettuata mediante immunoprecipitazione, immunosaggio (preferibilmente ELISA o RIA o saggio immunologico in fluorescenza), western blot, analisi FACS o una tecnica immunocitochimica/immunoistochimica. Fra di essi è maggiormente preferito un saggio ELISA indiretto.

Un terzo oggetto della presente invenzione è un kit diagnostico per la determinazione della presen-

za di anticorpi anti-MCPyV in un campione di un fluido biologico di un soggetto, il kit comprendendo (i) un agente di cattura comprendente uno o più peptidi isolati come definiti in precedenza, e (ii) un reagente per la rivelazione dell'immunocomplesso eventualmente formatosi fra gli anticorpi anti-MCPyV e l'agente di cattura. Come reagente di rivelazione della presenza dell'immunocomplesso è preferito l'impiego di un anticorpo secondario anti-uomo.

Il kit diagnostico dell'invenzione può altresì comprendere un supporto solido di saggio, come ad esempio una piastra ELISA.

La sezione sperimentale che segue è fornita a scopo puramente illustrativo e non limitativo della portata dell'invenzione come definita dalle annesse rivendicazioni.

## **Sezione sperimentale**

### **Materiali e metodi**

#### **Campioni biologici**

I sieri di individui normali, maschi e femmine di età diversa, ci sono stati forniti da diverse Cliniche Universitarie, Ospedali e Centri di Ricerca, previa sottoscrizione del consenso informato in accordo con la dichiarazione di Helsinki. Il Comi-

tato Etico di Ferrara ha approvato lo studio, ID: 151078 (7).

### **Peptidi**

Le proteine strutturali o capsidiche dei virus polioma, verso le quali vengono prodotti gli anticorpi, sono codificate dalla regione tardiva del genoma virale. I peptidi dell'invenzione sono stati sintetizzati utilizzando tecniche e apparecchiature standard (12). I due peptidi sintetici dell'invenzione, utilizzati come antigeni specifici del MCPyV in un saggio immunologico per rilevare nei sieri gli anticorpi contro MCPyV (preferibilmente un test ELISA indiretto), hanno le seguenti sequenze amminoacidiche:

Peptide MCPyV-VP1 S (PEP-S) (24 amminoacidi):

NH<sub>2</sub>- NSPDLPTTSNWYTYTYDLQPKGSS -COOH (SEQ ID NO:1)

e

Peptide MCPyV-VP2/VP3 F (PEP-F) (25 amminoacidi):

NH<sub>2</sub>- SLSPTSRLQIQSNLVNLILNSRWVF -COOH (SEQ ID NO:2)

Le sequenze amminoacidiche dei peptidi PEP-S e PEP-F sono localizzate all'interno delle sequenze codificanti per i geni tardivi del virus MCPyV: le proteine VP 1, VP 2 e VP 3 (Figura 1). Nonostante le regioni geniche di MCPyV VP1 e VP2/VP3 presentano un certo grado di omologia con altri virus po-



lioma, tra cui JCPyV, BKPyV ed SV40, le analisi bioinformatiche effettuate dai presenti inventori hanno evidenziato che le regioni genomiche corrispondenti a PEP-S e PEP-F presentano vantaggiosamente una omologia estremamente ridotta quando comparate con gli altri virus polioma.

**Identificazione di anticorpi contro MCPyV nei sieri umani mediante saggio immunologico ELISA indiretto**

La procedura di saggio comprende diverse fasi, come precedentemente riportato (13-15).

1. Coating. I peptidi liofilizzati sono stati disciolti in Coating Buffer (Candor Bioscience GmbH - CABRU s.a.s. Milano) 1x fino a raggiungere la concentrazione di 100 µg/ml, aliquotati e sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'utilizzo. Sono state utilizzate piastre da 96 pozzetti in cui è stato fatto aderire il peptide sintetico in un passaggio definito "coating". I peptidi sono stati diluiti 1:2 in Coating Buffer 1X, ottenendo una concentrazione finale di 50 µg/ml. In ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di peptide così preparato mediante l'utilizzo di una pipetta multicanale, si è lasciata incubare la piastra al buio a 4°C per 16-18 ore in modo che il peptide aderisca correttamente al fondo del pozzetto della piastra. Dopo il

periodo d'incubazione a 4°C sono state effettuati tre lavaggi con 250 µl per pozzetto di Washing Buffer (Candor Bioscience GmbH - CABRU s.a.s. Milano) diluito 0,5x in acqua bidistillata, partendo da una concentrazione di stock 10x. Per effettuare i lavaggi, volti alla rimozione del peptide in eccesso, è stato utilizzato un washer (Thermo Elctron Corporation, Wellwash 4 MK 2. Pobbiano, Italia).

2. Blocking. Questa fase prevede l'aggiunta della Blocking Solution (Candor Bioscience GmbH - CABRU s.a.s. Milano), in grado di completare la saturazione di ciascun pozzetto, nel caso vi siano aree non coperte dal peptide. Con questa soluzione si evita l'interazione tra l'anticorpo primario eventualmente presente nei campioni di siero e la superficie della piastra. Sono stati aggiunti 200 µl di Blocking Solution in ogni pozzetto con una pipetta multicanale e la piastra è stata posta in incubazione per 90 minuti a 37°C, al buio. In seguito, sono stati effettuati tre lavaggi con 250 µl di Washing Buffer per ogni pozzetto, sempre utilizzando il washer.

3. Anticorpi primari. Una volta effettuati i lavaggi, i campioni di siero da saggiare sono stati posti nei pozzetti corrispondenti. In questo modo è

possibile verificare la presenza di eventuali anticorpi contro MCPyV presenti nel siero. I sieri sono stati diluiti 1:20 in Low Cross Buffer (Candor Bioscience GmbH - CABRU s.a.s. Milano, Italia); in ogni pozzetto sono stati aliquotati 100 µl di siero così diluito. Ogni campione è stato analizzato in doppio. La piastra è quindi stata fatta incubare a 37°C per 90 minuti al buio. In ogni esperimento è inoltre presente un controllo positivo rappresentato da siero di: (i) pazienti affetti da carcinoma delle cellule di Merkel (MCC), risultati in precedenza positivi agli anticorpi IgG contro MCPyV (7); (ii) sieri appartenenti ad individui sani risultati in precedenza positivi agli anticorpi IgG contro MCPyV (9). Inoltre sono stati inseriti tre controlli risultati negativi in esperimenti precedenti, che vengono utilizzati per l'identificazione del valore-soglia (cut-off).

4. Anticorpo secondario. Sono stati effettuati tre lavaggi con 250 µl di washing buffer per ogni pozzetto in modo da rimuovere il siero residuo. È stato utilizzato un anticorpo secondario di capra anti-umano coniugato con perossidasi (CalbioChem, Milano), diluito 1:10.000 in Low Cross Buffer. In ogni pozzetto sono stati aggiunti quindi 100 µl di

anticorpo secondario, utilizzando una pipetta multicanale. Si è lasciato incubare per 90 minuti a temperatura ambiente al buio.

5. Rilevazione e lettura allo spettrofotometro.

Sono stati effettuati tre lavaggi con 250 µl di Washing Buffer per ogni pozzetto, in modo da rimuovere l'anticorpo secondario residuo. Per effettuare una lettura allo spettrofotometro in grado di quantificare il livello di anticorpi eventualmente presenti nel siero, sono stati aggiunti a ciascun pozzetto 100 µl di 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS; Sigma, Milano) utilizzando una pipetta multicanale. La piastra è stata incubata a temperatura ambiente per 45 minuti al buio. La lettura è stata effettuata mediante uno spettrofotometro (Thermo Elctron Corporation, Wellwash 4 MK 2. Pobbiano, Italia) ad una lunghezza d'onda di 405 nm. I risultati ottenuti sono stati analizzati, in modo da valutare l'intervallo di densità ottica (OD) ottenuto, controllando che i valori dei duplicati nella stessa piastra abbiano valori paragonabili tra loro.

6. Determinazione del cut-off. Il valore di cut-off è stato determinato come descritto in precedenza (13-15). Nello specifico, il cut-off è stato de-

terminato per ogni esperimento, utilizzando le OD dei controlli negativi inseriti in piastra. Il valore-soglia è stato calcolato attraverso la media di tre controlli negativi a cui è stata sommata la tripla deviazione standard (+3D). Tale procedimento è coerente con esperimenti effettuati in precedenza e con la letteratura internazionale (13-15). Il valore del cut-off viene calcolato in ogni esperimento e varia a seconda del peptide utilizzato.

Al termine delle analisi, un campione viene considerato positivo per MCPyV se risulta positivo sia per il peptide MCPyV-VP1 S che per il peptide MCPyV-VP2/VP3 F, quindi avente valori di OD superiori ai valori soglia dei singoli esperimenti.

## **Risultati**

### **Saggio di specificità di due peptidi sintetici, PEP-S e PEP-F, impiegati come antigeni per svelare la presenza di anticorpi anti-MCPyV nel siero umano**

In un saggio ELISA indiretto sono stati esaminati complessivamente n=1080 campioni di siero per valutare la presenza di anticorpi contro MCPyV. Nello specifico, i campioni erano rappresentati da sieri di individui sani (n=1.080), stratificati per età: <1-4 anni (n=128), da 5 a 10 anni (n=54), da 11 a 17 anni (n=124), da 18 a 30 anni (n=130), da

31 a 40 anni (n=120), da 41 a 50 anni (n=141), da 51 a 65 anni (n=157), da 66 a 70 anni (n=40), da 71 a 75 anni (n=46), da 76 a 80 anni (n=57), da 81 a 85 anni (n=47), >86 anni (n=36).

**Prevalenza di anticorpi anti-MCPyV determinata con il saggio ELISA indiretto**

Con il saggio ELISA indiretto impiegante i peptidi PEP-S e PEP-F sono stati considerati MCPyV-positivi solo i sieri risultati contemporaneamente positivi per entrambi i peptidi MCPyV-VP1 S e MCPyV-VP2/VP3 F utilizzati nel test. La prevalenza di anticorpi anti-MCPyV è risultata nel complesso del 55.3% (597/1080). I dati di prevalenza di anticorpi anti-MCPyV nei sottogruppi di individui sani stratificati per età sono riportati in Tabella 1. Nello specifico, la prevalenza di sieropositività più bassa, 11.7% (15/128), è stata riscontrata nel gruppo degli individui <1-4 anni. Infatti, la differenza di prevalenza di anticorpi anti-MCPyV nel gruppo degli individui <1-4 anni è risultata statisticamente inferiore rispetto ai gruppi 5-10 anni (48.1%, 26/54), 11-17 anni (55.6%, 69/124), 18-30 anni (63.1%, 82/130), 31-40 anni (56.7%, 68/120), 41-50 anni (64.5%, 91/141), 51-65 anni (66.2%, 104/157), 66-70 anni (62.5%, 25/40), 71-75 anni

(71.7%, 33/46), 76-80 anni (64.9%, 37/57), 81-85 anni (63.8%, 30/47), >86 anni (52.8%, 19/36) ( $p < 0.0001$ ) (Tabella 1). Inoltre, è stata riscontrata una prevalenza statisticamente inferiore di anticorpi anti-MCPyV, 48.1%, 26/54, nel gruppo degli individui di fascia di età 5-10 anni in comparazione con i gruppi 41-50 anni (64.5%, 91/141), 51-65 anni (66.2%, 104/157), 71-75 anni (71.7%, 33/46) ( $p < 0.05$ ) (Tabella 1).

**Tabella 1. Sieroprevalenza di anticorpi anti-MCPyV negli individui sani stratificati per età**

Range età (anni)	Numero campioni	Maschi (%)	Numero di campioni positivi (%)		
			VP1 S	VP2/3 F	VP1 S+VP2/3 F
Individui giovani (<1-17 anni, n=306)					
<1-4	128	57.8	24 (18.8)	27 (21.1)	15 (11.7)
5-10	54	42.6	30 (55.6)	30 (55.6)	26 (48.1)*
11-17	124	41.9	79 (63.7)	89 (71.8)	69 (55.6)*
Individui adulti/donatori di sangue (18-65 anni, n=548)					
18-30	130	20.8	92 (70.8)	90 (69.2)	82 (63.1)*
31-40	120	36.7	79 (65.8)	72 (60)	68 (56.7)*
41-50	141	39	104 (73.8)	102 (72.3)	91 (64.5)* <sup>Δ</sup>
51-65	157	53	122 (77.7)	108 (68.8)	104 (66.2)* <sup>Δ</sup>
Individui anziani (>66 anni, n=226)					
66-70	40	52.5	28 (70)	26 (65)	25 (62.5)*
71-75	46	50	33 (71.7)	39 (84.8)	33 (71.7)* <sup>Δ</sup>
76-80	57	56.1	39 (68.4)	38 (66.7)	34 (64.9)*
81-85	47	36.2	32 (68.1)	32 (68.1)	31 (63.8)*
>86	36	36.1	21 (58.3)	26 (72.2)	19 (52.8)*
Totale	1080	59	683 (63.2)	679 (62.9)	599 (55.5)

\* $p < 0.0001$  vs <1-4; <sup>Δ</sup> $p < 0.05$  vs 5-10.

## Bibliografia



1. WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Malaria and Some Polyomaviruses (SV40, BK, JC, and Merkel Cell Viruses) in IARC Monograph 104. Evaluation of carcinogenic risks to humans, ed. WHO (Lyon, France: WHO), 169-193, 2013.
2. Bouvard V, Baan RA, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Straif K et al. Carcinogenicity of malaria and of some polyomaviruses. WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Lancet Oncol. 13(4):339-40, 2012.
3. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. Science 19, 1096-100, 2008.
4. Nicol JTJ et al. Age-specific seroprevalences of merkel cell polyomavirus, human polyomaviruses 6, 7, and 9, and trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. Clin. Vaccine Immunol.20, 363-68.2013.
5. Mazzone E et al. Detection of Merkel Cell Polyomavirus DNA in Serum Samples of Healthy Blood Donors. Front Oncol.7, 294.2017.

6. Pancaldi C et al. Merkel cell polyomavirus DNA sequences in the buffy coats of healthy blood donors. *Blood*.117, 7099-7101.2011.
7. Rotondo JC et al. Merkel Cell Carcinomas Arising in Autoimmune Disease Affected Patients Treated with Biologic Drugs, Including Anti-TNF. *Clin Cancer Res*.23, 3929-34.2017.
8. Tagliapietra A, et al. Droplet-digital PCR assay to detect Merkel cell polyomavirus sequences in chorionic villi from spontaneous abortion affected females. *J Cell Physiol*. 2020 Mar;235(3):1888-1894.
9. Touzé A et al. Generation of Merkel cell polyomavirus (MCV)-like particles and their application to detection of MCV antibodies. *J Clin Microbiol*. 2010 May;48(5):1767-70.
10. Samimi et al, Prognostic value of antibodies to Merkel cell polyomavirus T antigens and VP1 protein in patients with Merkel cell carcinoma. *BJD*. 2016. *Br J Dermatol*. 2016 Apr;174(4):813-22.
11. Cason et al, Antibody response to polyomavirus primary infection: high seroprevalence of Merkel

cell polyomavirus and lymphoid tissue involvement.  
Journal of NeuroVirology (2018) 24:314-322..

12. Guerrini et al. Address and message sequences for the nociceptin receptor - A structure activity study of nociception (1-13) amide. J. Med. Chem., 40, 1789-93, 1997
13. Bononi I et al. Serum IgG antibodies from healthy subjects up to 100 years old react to JC polyomavirus. J Cell Physiol.233:5513-22, 2018.
14. Mazzone E et al. Serum IgG Antibodies from Pregnant Women Reacting to Mimotopes of Simian Virus 40 Large T Antigen, the Viral Oncoprotein. Front Immunol.8,411, 2017.
15. Pietrobon S et al. Specific IgG Antibodies React to Mimotopes of BK Polyomavirus, a Small DNA Tumor Virus, in Healthy Adult Sera. Front. Immunol. 8, 236, 2017.

## RIVENDICAZIONI

1. Peptide isolato del virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV), consistente nella sequenza amminoacidica SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2.
2. Procedimento per la rivelazione di anticorpi anti-MCPyV in un campione di un fluido biologico di un soggetto, comprendente le fasi di:
  - a) porre a contatto detto campione con un agente di cattura comprendente un peptide isolato consistente nella sequenza amminoacidica SEQ ID NO.1 o un peptide isolato consistente nella sequenza amminoacidica SEQ ID NO:2 o entrambi i suddetti peptidi isolati; e
  - b) rilevare la formazione di un immunocomplesso fra gli anticorpi anti-MCPyV e l'agente di cattura, in cui la formazione dell'immunocomplesso è indicativa della presenza di anticorpi anti-MCPyV nel campione di fluido biologico.
3. Procedimento secondo la rivendicazione 2, in cui i suddetti anticorpi anti-MCPyV sono anticorpi IgG e/o IgM umani.
4. Procedimento secondo la rivendicazione 3, in cui la formazione dell'immunocomplesso è rivelata mediante l'impiego di un anticorpo secondario anti-uomo.

5. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 2 a 4, in cui il fluido biologico è scelto dal gruppo che consiste di siero, plasma, sangue, saliva, urina, o liquido cefalorachidiano.
6. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 2 a 5, in cui il soggetto è un individuo affetto da una patologia neoplastica, un individuo immunocompromesso, un individuo affetto da sclerosi multipla o patologia autoimmune trattato con anticorpo monoclonale, oppure è un individuo sano.
7. Procedimento secondo la rivendicazione 6, in cui la patologia neoplastica è il carcinoma delle cellule di Merkel (MCC).
8. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 2 a 7, in cui l'immunocomplesso è rilevato mediante immunoprecipitazione; immunosaggio, preferibilmente ELISA o RIA o saggio immunologico in fluorescenza; western blot; analisi FACS; oppure una tecnica immunocitochimica/immunoistochimica.
9. Procedimento secondo la rivendicazione 8, che è un saggio immunologico del tipo ELISA indiretto.
10. Kit diagnostico per la determinazione della presenza di anticorpi anti-MCPyV in un campione di un fluido biologico di un soggetto sospettato di essere infettato da MCPyV, comprendente:

- un agente di cattura comprendente un peptide isolato consistente nella sequenza amminoacidica SEQ ID NO.1 o un peptide isolato consistente nella sequenza amminoacidica SEQ ID NO:2 o entrambi i suddetti peptidi isolati, e

- un reagente per rilevare la formazione di un immunocomplesso fra gli anticorpi anti-MCPyV e il suddetto agente di cattura.

11. Kit diagnostico secondo la rivendicazione 10, comprendente un anticorpo secondario anti-uomo come reagente di rivelazione dell'immunocomplesso.

12. Kit diagnostico secondo la rivendicazione 10 o 11, comprendente una piastra ELISA come supporto solido di saggio.

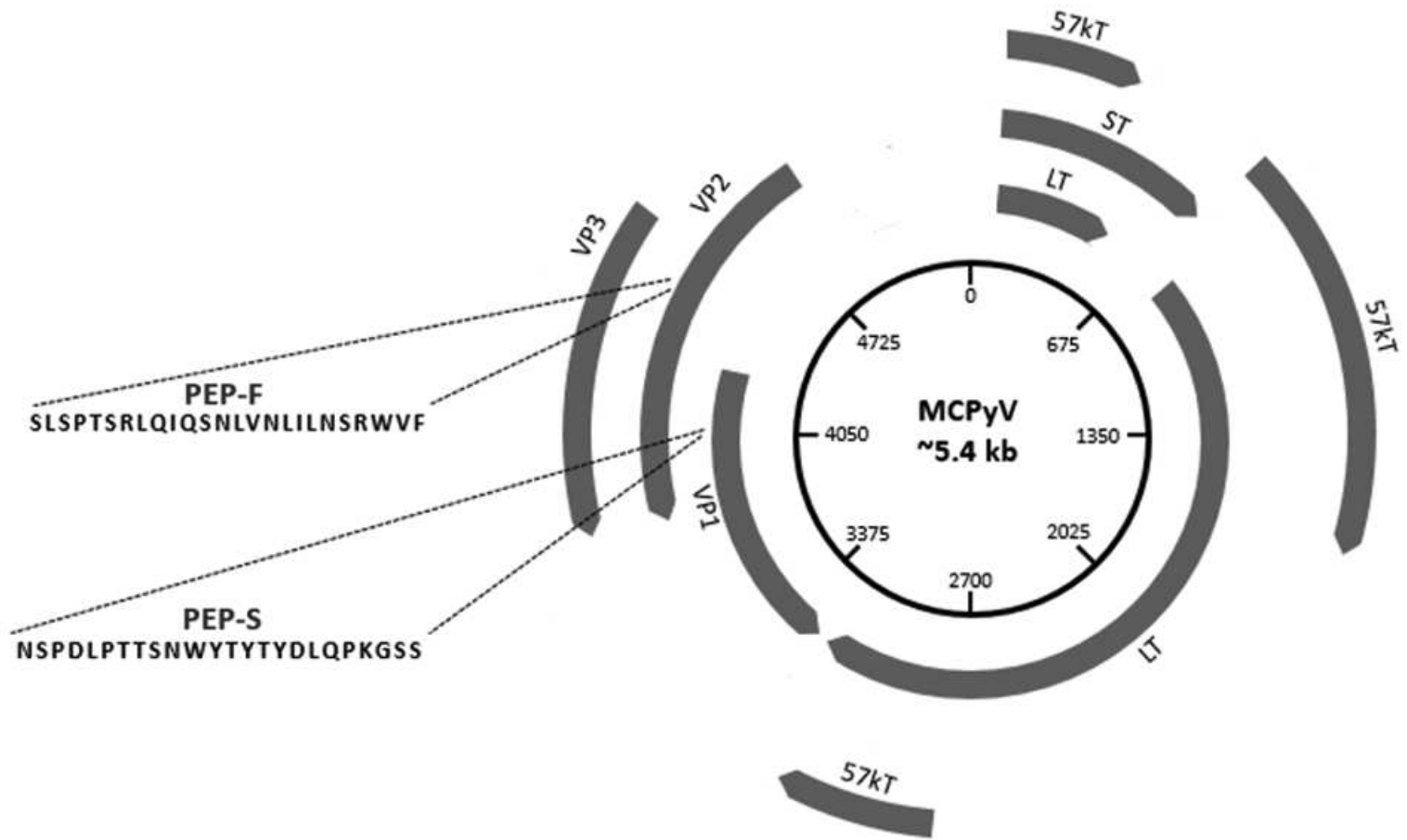


Fig. 1



# Ministero dello Sviluppo Economico

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

## RAPPORTO DI RICERCA

Numero della domanda

IO 102521

IT 202000021235

DOCUMENTI CONSIDERATI DI RILIEVO			
Categoria	Citazione del documento con indicazione, se appropriata, delle parti rilevanti	Rivendicazioni rilevanti	CLASSIFICAZIONE DELLA DOMANDA (IPC)
X	TOLSTOV YANIS L. ET AL: "Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 125, no. 6, 15 September 2009 (2009-09-15), pages 1250-1256, XP055804101, US ISSN: 0020-7136, DOI: 10.1002/ijc.24509 * abstract ; pg 1250, col 2, para 1-2 ; pg 1251, col 1, last para ; Fig 1-2 *	1-12	INV. G01N33/569 C07K14/025
X	CASON CAROLINA ET AL: "Antibody response to polyomavirus primary infection: high seroprevalence of Merkel cell polyomavirus and lymphoid tissue involvement", JOURNAL OF NEUROVIROLOGY, INFORMA HEALTHCARE, GB, vol. 24, no. 3, 12 January 2018 (2018-01-12), pages 314-322, XP036521696, ISSN: 1355-0284, DOI: 10.1007/S13365-017-0612-2 [retrieved on 2018-01-12] * abstract ; pg 315, col 2, para 2 *	1-12	CAMPI TECNICI RICERCATI (IPC) G01N C07K
X	WO 2009/079481 A2 (UNIV PITTSBURGH [US]; US HEALTH [US] ET AL.) 25 June 2009 (2009-06-25) * claim 8-9, 11-12 ; para 8, 10, 15-16, 74-75, 78, 91 *	1-12	
A	US 2011/182901 A1 (PETER MARTINE [FR] ET AL) 28 July 2011 (2011-07-28) * paragraph [0135] *	1-12	
Questo rapporto di ricerca è stato redatto sulla base di tutte le rivendicazioni			
The Hague		Data di completamento della ricerca 17 May 2021	Esaminatore Vadot-Van Geldre, E
CATEGORIA DEI DOCUMENTI CITATI			
X : di particolare rilevanza se considerato singolarmente Y : di particolare rilevanza se combinato con un altro documento della stessa categoria A : informazione generica O : divulgazione orale P : documento intermedio		T : teoria o principio alla base dell'invenzione E : documento brevettuale antecedente, ma pubblicato dopo o alla data di deposito D : documento citato nella domanda L : documento citato per altre ragioni ..... & : membro della stessa famiglia di brevetti, documento corrispondente	

1

EPO FORM 1503 07.08 (P04C74)



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

IO 102521  
IT 202000021235

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 17-05-2021

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 2009079481 A2	25-06-2009	US 2011135598 A1 US 2014037581 A1 US 2016046696 A1 WO 2009079481 A2	09-06-2011 06-02-2014 18-02-2016 25-06-2009
-----			
US 2011182901 A1	28-07-2011	NONE	
-----			



# Ministero dello Sviluppo Economico

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

OPINIONE SCRITTA

N. dossier IO102521	Data di deposito (gg/mm/aa) 08.09.2020	Data di priorità (gg/mm/aa)	N. domanda IT202000021235
Classificazione Internazionale dei Brevetti (IPC) INV. G01N33/569 C07K14/025			
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 Vadot-Van Geldre, E
--	------------------------------------

## OPINIONE SCRITTA

N. domanda

IT202000021235

---

### 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 e necessarie per l'invenzione di cui oggetto nelle rivendicazioni, questa opinione è stata redatta sulla base di:
  - a. tipo di materiale:
    - una sequenza di DNA
    - una o più tabelle relative alla sequenza di DNA
  - b. formato del materiale:
    - cartaceo
    - elettronico
  - c. momento di deposito o presentazione:
    - depositato insieme alla domanda al momento del deposito della medesima
    - depositato insieme alla domanda in formato elettronico
    - presentato successivamente al fine della ricerca d'antiorità
3.  Inoltre, ove sia stata depositata o presentata più di una versione o copia di una sequenza di DNA e/o tabella ad essa relativa, è stata presentata anche la dichiarazione obbligatoria che le informazioni contenute nelle copie successive o addizionali sono identiche a quelle nella domanda come depositata o che, in ogni caso, non vanno oltre il contenuto della domanda depositata originariamente.
4. Note aggiuntive:

**OPINIONE SCRITTA**

---

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

---

## 1. 1. Dichiarazione

Novità (N)	Sì: Rivendicazioni 1
	No: Rivendicazioni 2-12

Attività inventiva (IS)	Sì: Rivendicazioni
	No: Rivendicazioni 1-12

Applicazione industriale (IA)	Sì: Rivendicazioni 1-12
	No: Rivendicazioni

## 2. 2. Citazioni e spiegazioni

**si veda l'allegato**

Reference is made to the following documents:

D1: Tolstov et al, 2009. Int J of Canc, 125(6), 1250-1256 [XP055804101]

D2: Cason et al, 2018. J NeuroVir, 24, 314-322 [XP036521696]

D3: WO2009079481

D4: US2011182901 also the full length sequences (consisting)

1 **Re Item V**

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

- 1.1 The subject-matter of claims is 2-12 not novel
- 1.2 D1 (abstract ; pg 1250, col 2, para 1-2 ; pg 1251, col 1, last para ; Fig 1-2) discloses serological detection of antibodies against Merkel cell polyoma (MCPyV). The method involves incubation of the sample with a capture agent comprising VP1 and VP2 (i.e. comprising peptide of SEQ ID 1 and SQ ID 2) and detecting the antibodies present in serum samples using labeled anti-human antibodies. This document anticipates the subject-matter of claims 2-12.
- 1.3 D2 (abstract ; pg 315, col 2, para 2) discloses a method for detection of antibodies to VP1 of Merkel Cell polyoma virus in blood samples of patients using MCPyV344VP1 as a detection antigen (i.e. comprising peptide of SEQ ID 1). This document anticipates the subject-matter of claims 2-3, 5-6, 8, 10.
- 1.4 D3 (claim 8-9, 11-12 ; para 8, 10, 15-16, 74-75, 78, 91) discloses the use of MCV polypeptides (e.g. VP1, VP2 or VP3) for detection of antibodies to MCPyV (herein also called MCV). This document anticipates the subject-matter of claims 2-3, 5-6, 8, 10.
- 2 The subject-matter of claim 1 is novel, but does not involve an inventive step.
  - 2.1 All of the documents cited above disclose the polypeptide VP1 and VP2. They constitute equally valid closest prior art documents, as they address the problem of detection of anti-MCPyV antibodies in patient samples.
  - 2.2 The subject-matter of claim 1 differs in that it concerns a fragment of said polypeptide.
  - 2.3 The effect is that Merkel cell polyomavirus infection can be detected.
  - 2.4 The objective technical problem can thus be formulated as the provision of a fragment of VP1 or VP2 for detection of antibodies against MCPyV.

- 2.5 The solution, as identified by the difference above, does not involve an inventive step for the following reasons:
- 2.6 The skilled person starting from e.g. D1, D2 or D3 knows that these proteins are suitable for serological detection of MCPyV infection with no cross-reaction due to low polyomavirus homology (e.g. D3: para 75, 158). This view is corroborated by D4 (para 135) which also indicates that the VP1 capsid protein has significant differences in corresponding region in other human polyomaviruses. The skilled person will thus with a reasonable expectation of success use fragments of VP1, VP2 or VP3 thereby arriving at subject-matter falling within the scope of claim 1 without exercising inventive skill. No technical prejudice had to be overcome and no surprising advantages are shown,
- 3 The claims are industrially applicable.

Corso Emilia, 8 - 10152 Torino, Italy  
P.O. Box 321 - 10121 Torino Centro, Italy  
Tel.: (+39) 011.2440311  
Fax: (+39) 011.286300 - (+39) 011.286676  
jpto@jacobacci.com  
www.jacobacci.com

TORINO  
MILANO  
ROMA  
MADRID  
PARIS  
GENEVE  
BRESCIA  
PADOVA  
ALICANTE  
KILOMETROROSSO (BG)

**JACOBACCI**  
**PARTNERS**

**MINISTERO DELLO SVILUPPO  
ECONOMICO**

*Direzione Generale per la tutela della  
proprietà industriale*

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

DIVISIONE VII

Via Molise, 19

00187 ROMA RM

Torino, 7 Giugno 2022

Vs. rif.: Protocollo N. 158664 del 25.05.2021

Ns. Rif.: I0188839/BRE-EC/bra

(si prega di citare sempre il presente riferimento)

**Domanda di brevetto per invenzione industriale n. 102020000021235 del 08.09.2020**

**A nome: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FERRARA**

**Dal titolo "IMMUNOSAGGIO PER L'IDENTIFICAZIONE DI ANTICORPI CONTRO IL  
VIRUS POLIOMA DELLE CELLULE DI MERKEL (MCPYV) MEDIANTE L'USO DI PEPTIDI  
SINTETICI"**

**Procedimento di esame – replica a rilievo ministeriale**

---

Con riferimento alla domanda di brevetto citata in oggetto si risponde con la presente alla comunicazione ministeriale del 25 maggio 2021, con la quale codesto Ufficio ha assegnato termine al Richiedente per far pervenire proprie argomentazioni ed eventuali emendamenti alla domanda, alla luce del rapporto di ricerca e dell'allegata opinione di brevettabilità.

**1. Rispetto del termine**

Il termine di 3 mesi dalla scadenza dei 18 mesi di cui all'art. 53, comma 2 CPI scadrà l'8 giugno 2022. Pertanto, la presente risposta è depositata entro il termine assegnato.

**2. Riferimento ad istanza di rettifica della domanda ai sensi dell'Art. 172 CPI**

Nel riconsiderare l'oggetto della presente domanda, in particolare in vista della tecnica nota di cui il Richiedente è venuto a conoscenza con il rapporto di ricerca, si

sottopongono all'attenzione dell'Esaminatore una descrizione e delle rivendicazioni modificate, in sostituzione della descrizione e delle rivendicazioni originariamente depositate.

Il Richiedente formula pertanto istanza per rettificare la descrizione e le rivendicazioni sostituendo il testo della descrizione e delle rivendicazioni originariamente depositato con il testo modificato unito in allegato.

Si allega altresì una stesura modificata della descrizione e delle rivendicazioni ove le modifiche apportate sono chiaramente evidenziate.

Si confida nell'accoglimento della presente istanza.

### 3. Emendamenti

Gli emendamenti riguardano innanzitutto l'originaria rivendicazione 2, che è stata limitata alla forma di realizzazione del procedimento dell'invenzione secondo la quale gli anticorpi anti-MCPyV eventualmente presenti nel campione biologico del paziente da esaminare vengono rilevati mediante l'ausilio di entrambi i peptidi descritti nella domanda di brevetto, uno derivato alla proteina VP1 di MCPyV e l'altro derivato dalla proteina VP2 di MCPyV. Tali peptidi sono definiti nelle rivendicazioni come "consistenti" nelle rispettive sequenze aminoacidiche (SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2). Nella descrizione essi sono chiamati rispettivamente "PEP-S" e "PEP-F" (v. pag. 10).

In maniera analoga, anche l'originaria rivendicazione 10, che riguarda un kit diagnostico per l'attuazione del suddetto procedimento di rilevazione di anticorpi anti-MCPyV a fini diagnostivi, è stato limitato alla forma di realizzazione secondo la quale, come agenti di cattura, vengono utilizzati i due peptidi PEP-S e PEP-F sopra menzionati (cioè i peptidi consistenti rispettivamente nelle sequenze SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2).

La rivendicazione 1, che riguardava il peptide PEP-S (SEQ ID NO:1) o il peptide PEP-F (SEQ ID NO:2) in quanto tali, è stata cancellata. Conseguentemente, tutte le restanti rivendicazioni e le loro dipendenze sono state rinumerate.

La descrizione e il riassunto della domanda di brevetto sono stati anch'essi modificati in conformità con le rivendicazioni emendate.

Le modifiche apportate a rivendicazioni, descrizione e riassunto non comportano aggiunta di materia rispetto al contenuto della domanda iniziale.

### 4. Novità, attività inventiva ed applicazione industriale dell'invenzione

L'opinione di brevettabilità allegata al rapporto di ricerca emesso da codesto Ufficio riconosceva la sussistenza del requisito della novità per l'originaria rivendicazione 1, ma negava la sussistenza del requisito dell'altezza inventiva per tutte le rivendicazioni 1-12.



Come indicato nella sezione precedente, le rivendicazioni della presente domanda di brevetto sono ora state limitate ad una specifica forma di realizzazione che prevede l'impiego combinato dei due peptidi PEP-S e PEP-F come agenti di cattura.

Nessuna delle anteriorità citate nel rapporto di ricerca in relazione alla novità (ossia le anteriorità D1, D2 e D3) descrive un saggio per la rilevazione di anticorpi anti- MCPyV che impieghi la combinazione di due peptidi del virus MCPyV, uno derivato dalla proteina VP1 e l'altro derivato dalla proteina VP2/VP3. Inoltre, nessuna delle anteriorità citate descrive la specifica sequenza di PEP-S né di PEP-F.

Pertanto, le rivendicazioni della presente domanda di brevetto, così come ora emendate, sono evidentemente nuove a fronte delle anteriorità D1, D2 e D3.

Per ciò che concerne l'altezza inventiva, si concorda innanzitutto con l'esaminatore riguardo all'impiego del cosiddetto "*technical problem-solution approach*". Avendo proceduto a modificare le rivendicazioni, appare evidente che anche la definizione del problema tecnico, che rappresenta una fase cruciale nell'ambito del suddetto approccio, deve essere ora modificata.

Considerando D1 come la tecnica nota più vicina (perché presenta il maggior numero di caratteristiche tecniche in comune con la presente invenzione, nonché la stessa finalità), il procedimento della rivendicazione 1 (ex rivendicazione 2) differisce da D1 non solo nell'uso di polipeptidi specifici delle proteine VP1 e VP2/VP3 del virus poliooma delle cellule di Merkel (MCPyV), cioè i peptidi PEP-S e PEP-F, ma anche nel fatto che detti polipeptidi vengono utilizzati in combinazione l'uno con l'altro.

L'effetto tecnico complessivo di queste differenze è il miglioramento della specificità del saggio. Entrambe le caratteristiche distintive sopra identificate contribuiscono a questo miglioramento.

Si nota innanzitutto che i peptidi PEP-S e PEP-F consistono in brevi sequenze peptidiche uniche in MCPyV, che rappresentano epitopi specifici e bersagli immunologici selettivi per gli anticorpi presenti nei sieri e altri fluidi di soggetti infettati da MCPyV (v. primo paragrafo di pag. 7 della domanda di brevetto). Tali peptidi sono stati identificati dai presenti inventori tramite lo studio delle regioni genomiche ad essi corrispondenti, che, sorprendentemente, presentano un minor grado di omologia con quelle degli altri poliomavirus (v. paragrafo a cavallo delle pag. 10 e 11 della domanda di brevetto). Non vi è nulla nelle anteriorità citate nel rapporto di ricerca che avrebbe orientato la persona esperta del settore all'identificazione di queste specifiche regioni delle proteine VP1 e VP2/VP3, che presentano un minor grado di omologia con le corrispondenti regioni degli altri poliomavirus.

In aggiunta, l'impiego della combinazione dei due peptidi PEP-S e PEP-F è un'ulteriore caratteristica che consente di incrementare la specificità del saggio. Ciò si evince chiaramente dalla Tabella 1 della domanda di brevetto, in cui viene mostrato il confronto fra i risultati di sieroprevalenza ottenuti utilizzando i peptidi PEP-S e PEP-F separatamente o in combinazione l'uno con l'altro. La tabella mostra che la combinazione dei due peptidi porta all'identificazione di una % significativamente inferiore di campioni positivi, il che è indicativo di una maggiore specificità del saggio.

Alla luce di quanto sopra illustrato, si ritiene che il procedimento e il kit che formano oggetto delle rivendicazioni 1-11 come ora emendate, e che sono basati sull'uso dei peptidi PEP-S e PEP-F in combinazione l'uno con l'altro, non siano derivabili in modo ovvio dallo stato della tecnica e siano quindi dotati di altezza inventiva.

5. Richiesta

Si richiede rispettosamente a codesto Ufficio di riconsiderare le obiezioni espresse nell'opinione di brevettabilità allegata al rapporto di ricerca e di voler concedere il brevetto, accogliendo la contestuale istanza di rettifica della domanda.

Con osservanza.

Per incarico di: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FERRARA

Il Mandatario  
Elena Comoglio

(iscrizione all'Albo n. 1116B)  
c/o JACOBACCI & PARTNERS

All.:

- descrizione modificata
- rivendicazioni modificate
- riassunto modificato
- descrizione con modifiche evidenziate
- rivendicazioni con modifiche evidenziate
- riassunto con modifiche evidenziate

RIASSUNTO

Sono descritti un procedimento di saggio *in vitro* per la rilevazione di anticorpi diretti contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) in un campione di un fluido biologico di un soggetto sospettato di essere infettato da MCPyV ed il relativo kit. Il procedimento e il kit dell'invenzione si basano sull'impiego come agente di cattura di due peptidi isolati caratteristici del virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV), che non danno reazione crociata con altri virus Polioma.

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:  
"Immunosaggio per l'identificazione di anticorpi  
contro il virus polioma delle cellule di Merkel  
(MCPyV) mediante l'uso di peptidi sintetici"

Di: Università degli Studi di Ferrara, nazionalità  
italiana, Via Ariosto 35, 44121 Ferrara (Italia).

Inventori designati: MARTINI, Fernanda; ROTONDO,  
John Charles; MAZZONI, Elisa; TORREGGIANI, Elena;  
MAZZIOTTA, Chiara; LANZILLOTTI, Carmen; TOGNON,  
Mauro.

Depositata il:

\* \* \*

#### DESCRIZIONE

La presente invenzione rientra nel settore  
dell'immunodiagnostica.

Più in particolare, la presente invenzione ri-  
guarda un saggio immunologico, preferibilmente del  
tipo ELISA indiretto, per l'identificazione della  
presenza di anticorpi contro il virus polioma delle  
cellule di Merkel (MCPyV) in un campione di fluido  
biologico di un soggetto preferibilmente umano.

Il virus polioma delle cellule di Merkel è uno  
dei 14 virus polioma umani ad oggi conosciuti  
(1,2). Il suo genoma è stato identificato, nel  
2008, integrato nel DNA cellulare di un carcinoma

delle cellule di Merkel (MCC), un raro tumore umano della pelle (3). MCPyV, come gli altri virus polio-  
ma umani, ad esempio BKPyV e JCPyV, è ubiquitario, cioè ampiamente diffuso nella popolazione umana (1,2). I virus polio-  
ma, in genere, non causano ma-  
lattie in soggetti sani e, sebbene diversi virus siano associati a malattie negli ospiti immunocom-  
promessi, MCPyV è l'unico direttamente associato al cancro (3). Infatti, MCPyV è stato classificato dalla WHO/IARC come probabilmente cancerogeno per l'uomo (gruppo 2A) (1,2)

Il carcinoma delle cellule di Merkel (MCC), sebbene sia un tumore raro della pelle è molto ag-  
gressivo. MCC presenta un alto tasso di mortalità, circa 46% in 5 anni (3). Ha un'incidenza di 1/~3 milioni di casi all'anno in Europa. Tale tumore è comune tra soggetti bianchi ed anziani (>60 anni) con un eccesso di esposizione ai raggi UV. Il virus oncogeno a DNA, MCPyV, è il suo agente eziologico. Infatti, il DNA di MCPyV è presente in circa l'80% di tutti i MCC (3). Anticorpi anti-MCPyV sono presenti in quasi il 100% di pazienti con MCC, nel 60-80% di adulti sani e nel 35% di bambini di 1-5 anni di età (4). Questi dati indicano che MCPyV è ubi-  
quitario. Il DNA di MCPyV è stato rilevato nello

strato leucocitario-piastrinico e in sieri di adulti sani con prevalenze del 22% e 2,6% indicando che MCPyV può replicarsi nei soggetti sani, riattivandosi dalla sua fase latente (5,6). Infatti, dopo l'infezione primaria che avviene in età pediatrica, MCPyV rimane latente in ospiti immunocompetenti, fino a quando un indebolimento del sistema immunitario porta alla riattivazione virale, integrazione del DNA virale nel genoma umano, con conseguente espressione permanente delle due oncoproteine virali, gli antigeni Large T (LT) e small T (ST). Similmente, è noto che una riattivazione e conseguente infezione dei virus polioma umani (3), inclusi JCPyV e BKPyV, può essere indotta da un deficit immunitario.

Negli ospiti immunocompromessi, il rischio d'insorgenza dell'MCC aumenta (7); infatti circa il 10% dei pazienti affetti da MCC mostra deficit immunitari. I pazienti immunosoppressi sono anche più inclini a sviluppare tumori virus-associati, tra cui il sarcoma di Kaposi e il linfoma di Burkitt, associati rispettivamente agli herpesvirus HHV8/KSHV e EBV.

Ai fini di ricerca scientifica, alcuni gruppi, compreso quello dei presenti inventori, hanno im-

piegato tecniche di biologia molecolare, come le metodiche della reazione a catena della polimerasi (PCR) sia qualitativa che quantitativa, per svelare la presenza di sequenze di DNA di MCPyV in campioni umani (7, 8). Tuttavia, attualmente non sono disponibili in commercio metodi specifici, rapidi, e poco costosi che utilizzino tecniche immunologiche per verificare la presenza di anticorpi contro MCPyV nell'uomo. Infatti, le attuali tecniche immunologiche riportate nella letteratura scientifica sono basate sull'utilizzo delle "virus-like particles" (VLPs), aggregati di VP1 ricombinante di MCPyV che si auto-assemblano *in vitro* (9). Le VLPs come antigene virale vengono impiegate per la ricerca di anticorpi anti-MCPyV. La produzione delle VLPs prevede diversi e laboriosi passaggi, tra cui la sintesi *in vitro* a partire da cellule di *Spodoptera frugiperda*, o altro batterio ricombinante, l'isolamento, la quantificazione ed infine l'impiego con test ELISA per verificare la presenza di anticorpi contro MCPyV (9, 10). Alternativamente, studi più recenti riportano lo sviluppo di metodi ELISA basati sul rilevamento multiplo di anticorpi denominato "Multiplex Serology" basato sull'impiego di microsferi fluorescenti, in combi-

nazione con la glutatione S-transferasi (GST). Tali sistemi, seppur innovativi poiché permettono il rilevamento contemporaneo di differenti virus, presentano varie limitazioni metodologiche in quanto sono basati comunque sull'impiego delle VLPs o proteine ricombinanti solubili (10, 11). Infatti, è importante far notare che l'utilizzo di proteine ricombinanti VLPs potrebbe far aumentare le probabilità di cross-reazione tra diversi virus che, seppur differenti, presentano un certo grado di omologia, e quindi inficiare il risultato ottenuto (9, 10, 11).

Visto l'attuale stato delle conoscenze, è evidente l'importanza di disporre di metodi di analisi standardizzati, specifici, sensibili, rapidi, e di basso costo che consentano di identificare in maniera inequivocabile la presenza di anticorpi contro MCPyV, sia nei sieri di pazienti affetti da patologie diverse, incluse le neoplasie come MCC, che in individui sani, per esempio donatori di sangue, di cellule staminali e di organi.

È inoltre di primario interesse la sorveglianza immunologica per MCPyV nei pazienti trattati con anticorpi monoclonali, come ad esempio i pazienti affetti da sclerosi multipla e da patologie autoim-



muni, quali artrite reumatoide e spondilite anchilosante (7). Infatti, dati pregressi dei presenti inventori indicano un aumento di incidenza del MCC di circa mille volte in pazienti affetti da patologie autoimmuni in terapia con farmaci biologici, anticorpi monoclonali. Per tale scopo, monitorare nel tempo i livelli anticorpali contro MCPyV nei sieri di tali pazienti, con un metodo standardizzato, sensibile, rapido, e di basso costo è di primaria importanza per garantirne un outcome favorevole (7).

Queste ed altre esigenze sono soddisfatte dalla presente invenzione, che mette a disposizione il procedimento immunologico e il relativo kit definiti nelle annesse rivendicazioni indipendenti, idonei per la rivelazione di anticorpi anti-MCPyV in un campione di un fluido biologico di un soggetto o paziente da analizzare.

Ulteriori caratteristiche dell'invenzione sono identificate nelle rivendicazioni dipendenti, che formano parte integrante della descrizione.

La presente invenzione consente di sopperire alla mancanza di metodiche analitiche immunologiche specifiche mediante l'impiego di una serie di nuovi peptidi sintetici, usati come antigeni virali in un

saggio immunologico, che consentono di svelare la presenza di anticorpi contro MCPyV. In particolare, gli inventori hanno identificato brevi sequenze peptidiche uniche in MCPyV, che rappresentano epitopi specifici e bersagli immunologici selettivi per gli anticorpi presenti nei sieri e altri fluidi di soggetti infettati da MCPyV.

Tali peptidi corrispondono a uno specifico epitopo o antigene di una proteina virale capsidica 1, 2 o 3 (VP1, VP2 e VP3) del virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV), consistente nella sequenza amminoacidica SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2. Detti peptidi sono caratteristici di MCPyV, nel senso che non danno reazione crociata con altri virus polioma.

Un oggetto della presente invenzione è quindi un procedimento *in vitro* per la rivelazione di anticorpi anti-MCPyV in un campione di un fluido biologico di un soggetto, comprendente le fasi di:

- a) porre a contatto detto campione di fluido biologico con un peptide PEP-S consistente nella sequenza amminoacidica SEQ ID NO:1 e un peptide PEP-S consistente nella sequenza amminoacidica SEQ ID NO:2 quali agenti di cattura; e
- b) rilevare la formazione di un immunocomplesso fra

un anticorpo anti-MCPyV e i suddetti agenti di cattura, in cui la formazione dell'immunocomplesso è indicativa della presenza di anticorpi anti-MCPyV nel campione di fluido biologico.

In una forma di realizzazione preferita, gli anticorpi anti-MCPyV eventualmente presenti nel campione di fluido biologico sono anticorpi IgG e/o IgM umani. In tal caso, la formazione dell'immunocomplesso è rivelata mediante l'impiego di un anticorpo secondario anti-uomo.

In un'altra forma di realizzazione preferita, il fluido biologico da analizzare è scelto dal gruppo che consiste di siero, plasma, sangue, saliva, urina, o liquido cefalorachidiano. Fra di essi è maggiormente preferito il siero.

In ancora un'altra forma di realizzazione preferita, la rilevazione dell'immunocomplesso è effettuata mediante immunoprecipitazione, immunosaggio (preferibilmente ELISA o RIA o saggio immunologico in fluorescenza), western blot, analisi FACS o una tecnica immunocitochimica/immunoistochimica. Fra di essi è maggiormente preferito un saggio ELISA indiretto.

Un terzo oggetto della presente invenzione è un kit diagnostico per la determinazione della presen-

za di anticorpi anti-MCPyV in un campione di un fluido biologico di un soggetto, il kit comprendendo i peptidi PEP-S e PEP-F come sopra definiti come agenti di cattura, e (ii) un reagente per la rivelazione dell'immunocomplesso eventualmente formatosi fra gli anticorpi anti-MCPyV e gli agenti di cattura. Come reagente di rivelazione della presenza dell'immunocomplesso è preferito l'impiego di un anticorpo secondario anti-uomo.

Il kit diagnostico dell'invenzione può altresì comprendere un supporto solido di saggio, come ad esempio una piastra ELISA.

La sezione sperimentale che segue è fornita a scopo puramente illustrativo e non limitativo della portata dell'invenzione come definita dalle annesse rivendicazioni.

### **Sezione sperimentale**

#### **Materiali e metodi**

##### **Campioni biologici**

I sieri di individui normali, maschi e femmine di età diversa, ci sono stati forniti da diverse Cliniche Universitarie, Ospedali e Centri di Ricerca, previa sottoscrizione del consenso informato in accordo con la dichiarazione di Helsinki. Il Comitato Etico di Ferrara ha approvato lo studio, ID:

151078 (7).

### **Peptidi**

Le proteine strutturali o capsidiche dei virus polioma, verso le quali vengono prodotti gli anticorpi, sono codificate dalla regione tardiva del genoma virale. I peptidi dell'invenzione sono stati sintetizzati utilizzando tecniche e apparecchiature standard (12). I due peptidi sintetici dell'invenzione, utilizzati come antigeni specifici del MCPyV in un saggio immunologico per rilevare nei sieri gli anticorpi contro MCPyV (preferibilmente un test ELISA indiretto), hanno le seguenti sequenze amminoacidiche:

Peptide MCPyV-VP1 S (PEP-S) (24 amminoacidi):

NH<sub>2</sub>- NSPDLPTTSNWYTYTYDLQPKGSS -COOH (SEQ ID NO:1)

e

Peptide MCPyV-VP2/VP3 F (PEP-F) (25 amminoacidi):

NH<sub>2</sub>- SLSPTSRLQIQSNLVNLIILNSRWVF -COOH (SEQ ID NO:2)

Le sequenze amminoacidiche dei peptidi PEP-S e PEP-F sono localizzate all'interno delle sequenze codificanti per i geni tardivi del virus MCPyV: le proteine VP 1, VP 2 e VP 3 (Figura 1). Nonostante le regioni geniche di MCPyV VP1 e VP2/VP3 presentano un certo grado di omologia con altri virus polioma, tra cui JCPyV, BKPyV ed SV40, le analisi

bioinformatiche effettuate dai presenti inventori hanno evidenziato che le regioni genomiche corrispondenti a PEP-S e PEP-F presentano vantaggiosamente una omologia estremamente ridotta quando comparate con gli altri virus polioma.

**Identificazione di anticorpi contro MCPyV nei sieri umani mediante saggio immunologico ELISA indiretto**

La procedura di saggio comprende diverse fasi, come precedentemente riportato (13-15).

1. Coating. I peptidi liofilizzati sono stati disciolti in Coating Buffer (Candor Bioscience GmbH - CABRU s.a.s. Milano) 1x fino a raggiungere la concentrazione di 100 µg/ml, aliquotati e sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'utilizzo. Sono state utilizzate piastre da 96 pozzetti in cui è stato fatto aderire il peptide sintetico in un passaggio definito "coating". I peptidi sono stati diluiti 1:2 in Coating Buffer 1X, ottenendo una concentrazione finale di 50 µg/ml. In ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di peptide così preparato mediante l'utilizzo di una pipetta multicanale, si è lasciata incubare la piastra al buio a 4°C per 16-18 ore in modo che il peptide aderisca correttamente al fondo del pozzetto della piastra. Dopo il periodo d'incubazione a 4°C sono state effettuati

tre lavaggi con 250 µl per pozzetto di Washing Buffer (Candor Bioscience GmbH - CABRU s.a.s. Milano) diluito 0,5x in acqua bidistillata, partendo da una concentrazione di stock 10x. Per effettuare i lavaggi, volti alla rimozione del peptide in eccesso, è stato utilizzato un washer (Thermo Elctron Corporation, Wellwash 4 MK 2. Pobbiano, Italia).

2. Blocking. Questa fase prevede l'aggiunta della Blocking Solution (Candor Bioscience GmbH - CABRU s.a.s. Milano), in grado di completare la saturazione di ciascun pozzetto, nel caso vi siano aree non coperte dal peptide. Con questa soluzione si evita l'interazione tra l'anticorpo primario eventualmente presente nei campioni di siero e la superficie della piastra. Sono stati aggiunti 200 µl di Blocking Solution in ogni pozzetto con una pipetta multicanale e la piastra è stata posta in incubazione per 90 minuti a 37°C, al buio. In seguito, sono stati effettuati tre lavaggi con 250 µl di Washing Buffer per ogni pozzetto, sempre utilizzando il washer.

3. Anticorpi primari. Una volta effettuati i lavaggi, i campioni di siero da saggiare sono stati posti nei pozzetti corrispondenti. In questo modo è possibile verificare la presenza di eventuali anti-

corpi contro MCPyV presenti nel siero. I sieri sono stati diluiti 1:20 in Low Cross Buffer (Candor Bioscience GmbH - CABRU s.a.s. Milano, Italia); in ogni pozzetto sono stati aliquotati 100 µl di siero così diluito. Ogni campione è stato analizzato in doppio. La piastra è quindi stata fatta incubare a 37°C per 90 minuti al buio. In ogni esperimento è inoltre presente un controllo positivo rappresentato da siero di: (i) pazienti affetti da carcinoma delle cellule di Merkel (MCC), risultati in precedenza positivi agli anticorpi IgG contro MCPyV (7); (ii) sieri appartenenti ad individui sani risultati in precedenza positivi agli anticorpi IgG contro MCPyV (9). Inoltre sono stati inseriti tre controlli risultati negativi in esperimenti precedenti, che vengono utilizzati per l'identificazione del valore-soglia (cut-off).

4. Anticorpo secondario. Sono stati effettuati tre lavaggi con 250 µl di washing buffer per ogni pozzetto in modo da rimuovere il siero residuo. È stato utilizzato un anticorpo secondario di capra anti-umano coniugato con perossidasi (CalbioChem, Milano), diluito 1:10.000 in Low Cross Buffer. In ogni pozzetto sono stati aggiunti quindi 100 µl di anticorpo secondario, utilizzando una pipetta mul-



ticanale. Si è lasciato incubare per 90 minuti a temperatura ambiente al buio.

5. Rilevazione e lettura allo spettrofotometro.

Sono stati effettuati tre lavaggi con 250 µl di Washing Buffer per ogni pozzetto, in modo da rimuovere l'anticorpo secondario residuo. Per effettuare una lettura allo spettrofotometro in grado di quantificare il livello di anticorpi eventualmente presenti nel siero, sono stati aggiunti a ciascun pozzetto 100 µl di 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS; Sigma, Milano) utilizzando una pipetta multicanale. La piastra è stata incubata a temperatura ambiente per 45 minuti al buio. La lettura è stata effettuata mediante uno spettrofotometro (Thermo Elctron Corporation, Wellwash 4 MK 2. Pobbiano, Italia) ad una lunghezza d'onda di 405 nm. I risultati ottenuti sono stati analizzati, in modo da valutare l'intervallo di densità ottica (OD) ottenuto, controllando che i valori dei duplicati nella stessa piastra abbiano valori paragonabili tra loro.

6. Determinazione del cut-off. Il valore di cut-off è stato determinato come descritto in precedenza (13-15). Nello specifico, il cut-off è stato determinato per ogni esperimento, utilizzando le OD

dei controlli negativi inseriti in piastra. Il valore-soglia è stato calcolato attraverso la media di tre controlli negativi a cui è stata sommata la tripla deviazione standard (+3D). Tale procedimento è coerente con esperimenti effettuati in precedenza e con la letteratura internazionale (13-15). Il valore del cut-off viene calcolato in ogni esperimento e varia a seconda del peptide utilizzato.

Al termine delle analisi, un campione viene considerato positivo per MCPyV se risulta positivo sia per il peptide MCPyV-VP1 S che per il peptide MCPyV-VP2/VP3 F, quindi avente valori di OD superiori ai valori soglia dei singoli esperimenti.

## **Risultati**

### **Saggio di specificità di due peptidi sintetici, PEP-S e PEP-F, impiegati come antigeni per svelare la presenza di anticorpi anti-MCPyV nel siero umano**

In un saggio ELISA indiretto sono stati esaminati complessivamente n=1080 campioni di siero per valutare la presenza di anticorpi contro MCPyV. Nello specifico, i campioni erano rappresentati da sieri di individui sani (n=1.080), stratificati per età: <1-4 anni (n=128), da 5 a 10 anni (n=54), da 11 a 17 anni (n=124), da 18 a 30 anni (n=130), da 31 a 40 anni (n=120), da 41 a 50 anni (n=141), da

51 a 65 anni (n=157), da 66 a 70 anni (n=40), da 71 a 75 anni (n=46), da 76 a 80 anni (n=57), da 81 a 85 anni (n=47), >86 anni (n=36).

**Prevalenza di anticorpi anti-MCPyV determinata con il saggio ELISA indiretto**

Con il saggio ELISA indiretto impiegante i peptidi PEP-S e PEP-F sono stati considerati MCPyV-positivi solo i sieri risultati contemporaneamente positivi per entrambi i peptidi MCPyV-VP1 S e MCPyV-VP2/VP3 F utilizzati nel test. La prevalenza di anticorpi anti-MCPyV è risultata nel complesso del 55.3% (597/1080). I dati di prevalenza di anticorpi anti-MCPyV nei sottogruppi di individui sani stratificati per età sono riportati in Tabella 1. Nello specifico, la prevalenza di sieropositività più bassa, 11.7% (15/128), è stata riscontrata nel gruppo degli individui <1-4 anni. Infatti, la differenza di prevalenza di anticorpi anti-MCPyV nel gruppo degli individui <1-4 anni è risultata statisticamente inferiore rispetto ai gruppi 5-10 anni (48.1%, 26/54), 11-17 anni (55.6%, 69/124), 18-30 anni (63.1%, 82/130), 31-40 anni (56.7%, 68/120), 41-50 anni (64.5%, 91/141), 51-65 anni (66.2%, 104/157), 66-70 anni (62.5%, 25/40), 71-75 anni (71.7%, 33/46), 76-80 anni (64.9%, 37/57), 81-85

anni (63.8%, 30/47), >86 anni (52.8%, 19/36) (p<0.0001) (Tabella 1). Inoltre, è stata riscontrata una prevalenza statisticamente inferiore di anticorpi anti-MCPyV, 48.1%, 26/54, nel gruppo degli individui di fascia di età 5-10 anni in comparazione con i gruppi 41-50 anni (64.5%, 91/141), 51-65 anni (66.2%, 104/157), 71-75 anni (71.7%, 33/46) (p<0.05) (Tabella 1).

**Tabella 1. Sieroprevalenza di anticorpi anti-MCPyV negli individui sani stratificati per età**

Range età (anni)	Numero campioni	Maschi (%)	Numero di campioni positivi (%)		
			VP1 S	VP2/3 F	VP1 S+VP2/3 F
Individui giovani (<1-17 anni, n=306)					
<1-4	128	57.8	24 (18.8)	27 (21.1)	15 (11.7)
5-10	54	42.6	30 (55.6)	30 (55.6)	26 (48.1)*
11-17	124	41.9	79 (63.7)	89 (71.8)	69 (55.6)*
Individui adulti/donatori di sangue (18-65 anni, n=548)					
18-30	130	20.8	92 (70.8)	90 (69.2)	82 (63.1)*
31-40	120	36.7	79 (65.8)	72 (60)	68 (56.7)*
41-50	141	39	104 (73.8)	102 (72.3)	91 (64.5)* <sup>Δ</sup>
51-65	157	53	122 (77.7)	108 (68.8)	104 (66.2)* <sup>Δ</sup>
Individui anziani (>66 anni, n=226)					
66-70	40	52.5	28 (70)	26 (65)	25 (62.5)*
71-75	46	50	33 (71.7)	39 (84.8)	33 (71.7)* <sup>Δ</sup>
76-80	57	56.1	39 (68.4)	38 (66.7)	34 (64.9)*
81-85	47	36.2	32 (68.1)	32 (68.1)	31 (63.8)*
>86	36	36.1	21 (58.3)	26 (72.2)	19 (52.8)*
Totale	1080	59	683 (63.2)	679 (62.9)	599 (55.5)

\*p<0.0001 vs <1-4; <sup>Δ</sup>p<0.05 vs 5-10.

## **Bibliografia**

1. WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Malaria and Some Polyomaviruses (SV40, BK, JC, and Merkel Cell Viruses) in IARC Monograph 104. Evaluation of carcinogenic risks to humans, ed. WHO (Lyon, France: WHO), 169-193, 2013.
2. Bouvard V, Baan RA, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Straif K et al. Carcinogenicity of malaria and of some polyomaviruses. WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Lancet Oncol. 13(4):339-40, 2012.
3. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. Science 19, 1096-100, 2008.
4. Nicol JTJ et al. Age-specific seroprevalences of merkel cell polyomavirus, human polyomaviruses 6, 7, and 9, and trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. Clin. Vaccine Immunol. 20, 363-68.2013.

5. Mazzoni E et al. Detection of Merkel Cell Polyomavirus DNA in Serum Samples of Healthy Blood Donors. *Front Oncol.*7, 294.2017.
6. Pancaldi C et al. Merkel cell polyomavirus DNA sequences in the buffy coats of healthy blood donors. *Blood.*117, 7099-7101.2011.
7. Rotondo JC et al. Merkel Cell Carcinomas Arising in Autoimmune Disease Affected Patients Treated with Biologic Drugs, Including Anti-TNF. *Clin Cancer Res.*23, 3929-34.2017.
8. Tagliapietra A, et al. Droplet-digital PCR assay to detect Merkel cell polyomavirus sequences in chorionic villi from spontaneous abortion affected females. *J Cell Physiol.* 2020 Mar;235(3):1888-1894.
9. Touzé A et al. Generation of Merkel cell polyomavirus (MCV)-like particles and their application to detection of MCV antibodies. *J Clin Microbiol.* 2010 May;48(5):1767-70.
10. Samimi et al, Prognostic value of antibodies to Merkel cell polyomavirus T antigens and VP1 protein in patients with Merkel cell carcinoma. *BJD.* 2016. *Br J Dermatol.* 2016 Apr;174(4):813-22.

11. Cason et al, Antibody response to polyomavirus primary infection: high seroprevalence of Merkel cell polyomavirus and lymphoid tissue involvement. *Journal of NeuroVirology* (2018) 24:314-322..
12. Guerrini et al. Address and message sequences for the nociceptin receptor - A structure activity study of nociception (1-13) amide. *J. Med. Chem.*, 40, 1789-93, 1997
13. Bononi I et al. Serum IgG antibodies from healthy subjects up to 100 years old react to JC polyomavirus. *J Cell Physiol.*233:5513-22, 2018.
14. Mazzoni E et al. Serum IgG Antibodies from Pregnant Women Reacting to Mimotopes of Simian Virus 40 Large T Antigen, the Viral Oncoprotein. *Front Immunol.*8,411, 2017.
15. Pietrobon S et al. Specific IgG Antibodies React to Mimotopes of BK Polyomavirus, a Small DNA Tumor Virus, in Healthy Adult Sera. *Front. Immunol.* 8, 236, 2017.

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la rivelazione di anticorpi anti-MCPyV in un campione di un fluido biologico di un soggetto, comprendente le fasi di:

a) porre a contatto detto campione di fluido biologico con un peptide PEP-S consistente nella sequenza amminoacidica SEQ ID NO:1 e con un peptide PEP-F consistente nella sequenza amminoacidica SEQ ID NO:2 quali agenti di cattura; e

b) rilevare la formazione di un immunocomplesso fra gli anticorpi anti-MCPyV eventualmente presenti nel campione di fluido biologico e i suddetti agenti di cattura, in cui la formazione dell'immunocomplesso è indicativa della presenza di anticorpi anti-MCPyV nel campione di fluido biologico.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui i suddetti anticorpi anti-MCPyV sono anticorpi IgG e/o IgM umani.

3. Procedimento secondo la rivendicazione 2, in cui la formazione dell'immunocomplesso è rivelata mediante l'impiego di un anticorpo secondario anti-uomo.

4. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 3, in cui il fluido biologico è scelto dal gruppo che consiste di siero, plasma, san-



gue, saliva, urina, o liquido cefalorachidiano.

5. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4, in cui il soggetto è un individuo affetto da una patologia neoplastica, un individuo immunocompromesso, un individuo affetto da sclerosi multipla o patologia autoimmune trattato con anticorpo monoclonale, oppure è un individuo sano.

6. Procedimento secondo la rivendicazione 5, in cui la patologia neoplastica è il carcinoma delle cellule di Merkel (MCC).

7. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 6, in cui l'immunocomplesso è rilevato mediante immunoprecipitazione; immunosaggio, preferibilmente ELISA o RIA o saggio immunologico in fluorescenza; western blot; analisi FACS; oppure una tecnica immunocitochimica/immunoistochimica.

8. Procedimento secondo la rivendicazione 7, che è un saggio immunologico del tipo ELISA indiretto.

9. Kit diagnostico per la determinazione della presenza di anticorpi anti-MCPyV in un campione di un fluido biologico di un soggetto sospettato di essere infettato da MCPyV, comprendente:

- un peptide PEP-S consistente nella sequenza amminoacidica SEQ ID NO:1 e un peptide PEP-F consistente nella sequenza amminoacidica SEQ ID NO:2 come

agenti di cattura, e

- un reagente per rilevare la formazione di un immunocomplesso fra gli anticorpi anti-MCPyV e i suddetti agenti di cattura.

10. Kit diagnostico secondo la rivendicazione 9, comprendente un anticorpo secondario anti-uomo come reagente di rivelazione dell'immunocomplesso.

11. Kit diagnostico secondo la rivendicazione 9 o 10, comprendente una piastra ELISA come supporto solido di saggio.



*Ministero dello Sviluppo Economico*

Direzione generale per la tutela della proprietà industriale

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

## ATTESTATO DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

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

**N. 102020000021235**

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

Rambelli Paolo Giuseppe Domenico

DOMICILIO: Jacobacci & Partners S.p.A.  
corso Emilia 8  
10152 Torino

INVENTORE/I: • MARTINI Fernanda  
• TOGNON Mauro  
• LANZILLOTTI Carmen  
• MAZZIOTTA Chiara  
• TORREGGIANI Elena  
• MAZZONI Elisa  
• ROTONDO John Charles

TITOLO: Immunosaggio per l'identificazione di anticorpi contro il virus polioma delle cellule di Merkel (MCPyV) mediante l'uso di peptidi sintetici

CLASSIFICA: G01N

DATA DEPOSITO: 08/09/2020

Roma, 20/09/2022

Il Dirigente della Divisione VII  
*Loredana Guglielmetti*