



DNA di poliomavirus in pazienti con sclerosi multipla in terapia con Natalizumab

Matteo Gastaldi, Luca Diamanti, Roberto Bergamaschi, Arrigo Moglia, Mauro Ceroni

*Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli Studi di Pavia, Fondazione
IRCCS Casimiro Mondino, Pavia, Italia*

DNA di poliomavirus in pazienti con sclerosi multipla in terapia con Natalizumab

La terapia con Natalizumab si associa ad un aumentato rischio di sviluppo di leucoencefalopatia multifocale progressiva. Dal momento che tale patologia ha una prognosi estremamente sfavorevole, l'individuazione di fattori di rischio e *markers* precoci di riattivazione virale potrebbe migliorare l'*outcome*.

Il nostro lavoro mirava ad indagare se la comparsa o l'incremento del DNA di poliomavirus nelle urine potesse rappresentare un buon *marker* di riattivazione virale. Obiettivi secondari erano inoltre valutare gli effetti della terapia sulla concentrazione di leucociti periferici e confermare l'efficacia clinica del farmaco.

Abbiamo valutato mensilmente il livello di leucociti, la concentrazione sierica e le concentrazioni urinarie di JCV e BKV in 33 pazienti affetti da SM in trattamento con Natalizumab. Non si è riscontrato un incremento della concentrazione media di JCV. Non si sono riscontrate positivizzazioni. È stato riscontrato un *trend* di aumento delle concentrazioni urinarie medie di BKV.

Di questi 33 pazienti è stato valutato un sottogruppo di 15 pazienti arrivati a dodici mesi di terapia. È stato riscontrato un *trend* di aumento nella concentrazione sierica media di leucociti. È stata riscontrata una positivizzazione di BKV DNA a livello urinario. In dodici mesi i pazienti hanno mostrato una riduzione significativa del tasso di ricadute rispetto all'anno precedente e una riduzione dell'EDSS (*Expanded disability status score*).

Il monitoraggio delle concentrazioni urinarie di JCV DNA non sembra essere un buon *marker* per la riattivazione virale. Tale ruolo potrebbe essere ricoperto dal monitoraggio delle concentrazioni urinarie di BKV.

Poliomavirus DNA in patients with multiple sclerosis under Natalizumab treatment

Natalizumab therapy is associated with an increased risk of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). Since the prognosis of PML is extremely poor, identification of patients highly susceptible to the disease may improve outcomes.

Our paper tries to find out if new positive result or increased JCV DNA concentration in urine samples may represent a good marker of viral reactivation. Secondary objectives are to assess the effects of therapy on leucocyte serum levels and evaluate drug efficacy.

Every month, we evaluated leucocyte level, JCV and BKV DNA serum and urine concentration in 33 patient with multiple sclerosis under Natalizumab treatment. We did not notice any variation in JCV DNA concentration, nor new positive results. We noticed an increasing trend in the average BKV DNA concentration in urine.

Fifteen out of 33 patients were treated for a period of 12 months. In this subgroup we noticed an increasing trend in leucyte serum levels and a BKV DNA new positive result in urine sample. After one year patients showed a significant decrease in relapse rate compared to the previous year and an improvement in EDSS.

Monitoring urine JCV DNA concentration does not seem an effective marker for viral reactivation. A good marker could be BKV DNA urine level.

Introduzione

La Sclerosi Multipla (SM) è una patologia demielinizzante disimmune del SNC caratterizzata da una componente sia infiammatoria sia neurodegenerativa. La malattia è probabilmente dovuta a un agente causale sconosciuto che agisce in soggetti predisposti geneticamente scatenando una risposta autoimmune con meccanismi di mimetismo molecolare [1]. Il primo a porre una correlazione tra la sintomatologia e le alterazioni anatomico-patologiche fu Jean Martin Charcot, il quale nel 1868 definì i criteri diagnostici dando alla Sclerosi Multipla una precisa collocazione nosografica. Questa patologia è senza dubbio uno dei disturbi neurologici più rilevanti per la frequenza, la cronicità e la tendenza a colpire giovani adulti. Attualmente non esistono cure risolutive per la SM. Le terapie utilizzate si dividono sostanzialmente in terapia della fase acuta (corticosteroidi e.v. ad alto dosaggio [2-3]), terapie immunomodulanti (Interferoni, Glatiramer Acetato) modificanti il decorso della malattia [4-6], terapie immunosoppressive riservate a forme *relapsing remitting* molto aggressive o a forme secondariamente progressive [7], e infine terapie con anticorpi monoclonali. Il Natalizumab è l'unico anticorpo monoclonale approvato per il trattamento della SM. Agisce selettivamente sul sistema immunitario, bloccando l'ingresso nel Sistema Nervoso Centrale (SNC) di linfociti ritenuti implicati nei meccanismi del danno mielinico [8-9]. Fin dalle prime fasi della sperimentazione il Natalizumab si è dimostrato un farmaco di notevole interesse, soprattutto in termini di efficacia. L'anticorpo monoclonale riduce il tasso di ricadute, la progressione della malattia, il numero e il volume delle lesioni attive alla RM [10-11]; di conseguenza una percentuale significativa di pazienti risulta libera da malattia, con miglioramento della qualità della vita. Nonostante le ottime premesse, Natalizumab era stato ritirato dal commercio nel febbraio 2005, in seguito alla segnalazione durante la fase III della sperimentazione farmacologica di due casi di leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML) insorta in pazienti in trattamento [12]; solo nel giugno 2006, dopo una revisione di tutti i dati degli oltre 3000 pazienti precedentemente trattati (e tutti risultati negativi per JCV) il farmaco è stato riammesso all'impiego nella pratica clinica, ma sotto strettissima vigilanza. Al momento attuale, il numero di pazienti con SM e trattati con Natalizumab che ha presentato PML è salito a 55, con una incidenza di 1.24 PML ogni 1000 pazienti trattati per pazienti/anno [13]. La PML è una rara patologia demielinizzante del SNC, spesso difficile da diagnosticare (specie in fase precoce), e per la quale non esiste un'adeguata terapia. Nella maggior parte dei casi, la PML determina il decesso del paziente o una grave disabilità residua. L'agente eziologico della PML è il JCV [14-15]. Si tratta di un virus latente [16], normalmente presente nell'organismo umano e contratto in giovane età, ma non è noto il meccanismo con cui il virus si riattivi. Non si conoscono né i fattori di rischio per lo sviluppo di PML, né sono stati identificati i *markers* della riattivazione del JCV, e neppure si conoscono i valori di *cut-off* ematici e/o urinari del JCV ritenuti prognostici di rischio di evoluzione verso la PML. Non si conosce inoltre il ruolo della presenza di anticorpi anti JCV nel siero [17-18]. Numerose sono le domande senza risposta riguardo la PML e soprattutto non è ancora del tutto chiaro il meccanismo attraverso il quale il farmaco porterebbe allo sviluppo della malattia. È stato dimostrato che il Natalizumab incrementa il numero di linfociti B circolanti, che rappresentano il principale veicolo di ingresso del virus attraverso la barriera ematoencefalica [19-20]; il quadro è ulteriormente complicato dalla possibilità che Natalizumab induca una

riattivazione asintomatica del JCV con incremento delle concentrazioni urinarie del virus e riscontro del DNA virale in circolo e all'interno di cellule periferiche circolanti mononucleate [21]. Tale incremento non è stato tuttavia riscontrato da lavori più recenti [22]. L'ultimo studio pubblicato al riguardo [23] non evidenzia né incremento di JCV DNA nelle urine né positivizzazioni significative a livello del plasma.

Scopo del lavoro

Dopo ampie dimostrazioni di elevato grado di specificità e di efficacia, gli anticorpi monoclonali anti-integrina sono stati approvati per il trattamento della Sclerosi Multipla remittente-ricidivante (SM RR) ed il loro impiego è entrato ormai nella pratica clinica.

Ad oggi, per il trattamento della SM RR, è utilizzato esclusivamente l'anticorpo monoclonale Natalizumab, ma un crescente numero di anticorpi monoclonali (Rituximab, Daclizumab, Alemtuzumab) è in fase avanzata di studio. Tuttavia, tutti questi farmaci innovativi possono produrre effetti collaterali anche gravi, che non devono quindi essere sottovalutati.

Lo studio in corso si propone di studiare una coorte di pazienti affetti da SM RR ed in trattamento con Natalizumab per individuare eventuali fattori di rischio per lo sviluppo di complicanze infettive (in particolare di PML), individuare *markers* di riattivazione precoce del *JC virus*, valutare l'efficacia e la tolleranza del trattamento.

Materiali e metodi

Sono stati inclusi pazienti affetti da SM con forma RR, candidati a terapia con Natalizumab e seguiti con regolarità presso il Centro di Ricerca Interdipartimentale sulla Sclerosi Multipla (CRISM) della Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Mondino di Pavia.

Dopo discussione degli obiettivi e delle procedure dello studio e dopo la raccolta della dichiarazione di consenso, i partecipanti allo studio sono stati sottoposti alle seguenti procedure di terapia, valutazione clinica e strumentale:

1. Terapia. I pazienti hanno ricevuto mensilmente un'infusione di 300 mg di Natalizumab per via endovenosa.
2. Follow up clinico. I pazienti sono stati sottoposti basalmente (T0) e mensilmente (da T1 a T18) alla raccolta di informazioni sullo stato clinico generale e neurologico, e a visita neurologica. La disabilità neurologica è stata quantificata attraverso la scala EDSS.
3. Follow up virologico. I pazienti sono stati sottoposti basalmente (T0) e mensilmente (da T1 a T18) a prelievi di campioni di plasma e urine. È stata effettuata la rilevazione del DNA di JCV e BKV su siero, sangue e PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) attraverso estrazione degli acidi nucleici e tecniche di PCR (*Polymerase Chain Reaction*) *real time*. Sono state effettuate inoltre rilevazioni per il genoma del virus *Herpes Simplex 1* (HSV1), del virus della Varicella Zoster (VZV), del virus di EB (EBV), del Citomegalovirus Umano (hCMV) e del virus Herpes Umano (HHV6) (le determinazioni sono state condotte presso il Laboratorio di Virologia del Centro di Ricerca Translazionale della Clinica San Giuseppe di Milano dell'Università di Milano). La sensibilità delle rilevazioni, conducendo le indagini su campioni di 5 µl di materiale biologico, era 2 copie/ml per il JCV e 5 copie/ml per il BKV, ovvero decisamente superiore a quella dei comuni *kit* commerciali che arrivano a 50 copie/ml (ViraCor) per il JCV.

4. Follow up ematochimico-ematologico. I pazienti sono stati sottoposti basalmente (T0) e mensilmente (da T1 a T18) ad analisi ematochimiche su sangue comprendenti emocromo con formula, funzionalità epatica (ALT, AST, fosfatasi alcalina, gammaGT, bilirubina) creatinina, con particolare attenzione ai livelli di leucociti (WBC).

Il campione è stato descritto sulla base delle variabili demografiche (età e sesso), cliniche (età all'esordio dei sintomi, scala di disabilità (EDSS) e numero di ricadute nell'anno precedente al trattamento), emato-chimico-immunologiche e virologiche (JCV, BKV e WBC).

Le concentrazioni delle variabili emato-chimico-immunologiche e virologiche sono state espresse come valore medio e mediano con le rispettive misure di variazione, deviazione standard (DS) e *range* interquartile (RIQ), rispettivamente. Inoltre sono state calcolate le percentuali di positività per JCV e per BKV.

La distribuzione delle variabili emato-chimico-immunologiche e virologiche (JCV, BKV e WBC) è stata descritta e rappresentata graficamente rispetto al tempo di *follow up*. Le eventuali variazioni di tali variabili rispetto al *follow up* sono state indagate con un modello di analisi della varianza ad una via per misure ripetute.

Per un sottocampione di pazienti osservato per almeno 12 mesi è stato eseguito un confronto (T0 vs T12) sia delle variabili cliniche che di quelle emato-chimico-immunologiche e virologiche. In particolare è stato utilizzato il test non parametrico di Wilcoxon per dati appaiati quando le variabili erano di tipo numerico e il test di McNemar quando le variabili erano di tipo categorico.

La significatività statistica è stata assunta tutte le volte in cui il *p value* è risultato $p < 0.05$. Le analisi sono state condotte utilizzando il pacchetto statistico StataSE 10 (*The Stata Corporation, College Station, TX*).

Nello studio sono stati inclusi un totale di 33 pazienti affetti da SM RR e sottoposti a terapia con Natalizumab. Il periodo di tempo considerato va dal 12/2008 al 6/2010, con un tempo di *follow up* variabile da 5 a 18 mesi. Quindici pazienti hanno raggiunto almeno 12 mesi di *follow up*. Il sottocampione di 15 pazienti seguiti per almeno 12 mesi non hanno mostrato differenze significative delle caratteristiche cliniche (sesso, età, età all'esordio dei sintomi, valore di EDSS, numero di ricadute nell'anno precedente) rispetto a quelle dei rimanenti 18 pazienti per i quali il *follow up* non arrivava a 12 mesi (Tabella 1).

Risultati

Campione Globale (33 pazienti)

- Valutazione virologica. Tra i 33 pazienti analizzati, 14 sono risultati positivi al JCV DNA a livello urinario (42.4%) fin dalla prima rilevazione con un valore medio di 7.3 [log(copie/ml)] (Tabella 2). Nessun soggetto è risultato positivo a livello del plasma ma un soggetto è risultato transitoriamente positivo alle PBMCs. Analizzando l'andamento temporale della concentrazione urinaria di JCV DNA dei soggetti risultati positivi basalmente (T0) non sono state rilevate variazioni significative dei valori medi nel tempo (Figura 1). Nessuno tra i 19 pazienti negativi basalmente ha presentato positivizzazione di JCV DNA nelle urine nel corso del *follow up*. Non è stata rilevata nessuna positività a livello del siero. È stata rilevata un'unica positività transitoria nelle PBMCs seguita da negativizzazione al controllo successivo. Tra i 30 pazienti analizzati, (i campioni non erano disponibili in 3) sei pazienti sono risultati positivi per il BKV DNA a livello urinario (20%) fin dalla prima rilevazione con un valore medio di 4.2 [log(copie/ml)]. Nessun soggetto è risultato positivo a livello del plasma o delle PBMCs (Tabella 3). Analizzando l'andamento temporale della concentrazione urinaria di BKV DNA dei soggetti risultati positivi basalmente (T0) (Figura 2) è stato rilevato un trend di aumento. Non è stata rilevata alcuna positività a livello del siero o delle PBMCs.

Nessun paziente è risultato positivo per HSV1 DNA, VZV DNA, hCMV DNA, EBV DNA o HH6 DNA nel sangue, nelle PBMCs o nelle urine.

- **Valutazione immunologica.** I leucociti sono stati valutati basalmente su 29 pazienti. Il valore medio è risultato di $7.5 \times 10^3 / \mu\text{L}$ (± 1.8) e la mediana di 7.2 (valori estremi di 6.5 e 8.5). Analizzando il grafico della curva dei valori medi di leucociti (Figura 3) non è stata individuata alcuna variazione significativa ($p=0.459$).

Sottogruppo con follow up di almeno 12 mesi

- **Valutazione virologica.** I pazienti sono stati valutati mensilmente per la presenza di JCV DNA urinario. Sei pazienti su 15 sono risultati positivi basalmente; tale positività si è confermata per l'intera durata del *follow up*, senza peraltro mostrare variazioni statisticamente significative della concentrazione di JCV DNA. (test non parametrico di Wilcoxon non significativo) (Tabella 4). I pazienti sono stati valutati mensilmente per la presenza di BKV DNA urinario. Su 15 pazienti 3 sono risultati positivi basalmente, e 4 a T12 (un paziente si è positivizzato, Tabella 5).
- **Valutazione immunologica.** I pazienti sono stati valutati mensilmente per la concentrazione di leucociti. È stato osservato un incremento statisticamente significativo nel valore dei globuli bianchi ($p=0.021$, Tabella 6).
- **Valutazione clinica.** I pazienti in terapia con Natalizumab sono stati sottoposti mensilmente a valutazione clinica neurologica. Dopo un anno di terapia con Natalizumab il numero medio di ricadute è diminuito significativamente, passando da 2.3 (± 1.4) a 0.5 (± 0.9), $p < 0.01$ (Tabella 7). Dopo un anno di terapia con Natalizumab il valore medio di disabilità è diminuito, passando da 3.2 (± 1.4) a 2.7 (± 1.70), seppure in modo non significativo (Tabella 8).

Discussione

I risultati ottenuti da questo studio confermano in primo luogo la notevole efficacia di Natalizumab nel modificare favorevolmente l'andamento della SM, considerando che la malattia è naturalmente caratterizzata da frequenti ricadute cliniche e dal progressivo accumulo di disabilità. Nel nostro gruppo di pazienti si è osservata la riduzione sia del numero medio di ricadute che della disabilità. In particolare, nel sottogruppo di 15 pazienti che hanno raggiunto un periodo di osservazione sufficientemente lungo (*follow up* 12 mesi) l'impatto sul rischio di ricaduta è stato netto, dal momento che la maggior parte dei pazienti non ha presentato alcuna ricaduta durante l'anno di trattamento, ed il numero medio di ricadute è passato da 2.3 a 0.5 al termine del *follow up*. Anche il livello di disabilità ha mostrato un trend favorevole (seppure non significativo, in considerazione della ridotta numerosità) passando da un punteggio medio di disabilità calcolato con la scala EDSS di 3.2 punti, ad un punteggio di 2.7).

La terapia ha quindi dimostrato una notevole efficacia clinica, senza che si sia rilevato un maggiore rischio di PML, almeno nel nostro piccolo numero di casi. Prima di iniziare la terapia, il nostro campione di pazienti ha mostrato una prevalenza del JCV DNA nelle urine del 42%, lievemente maggiore di quella riscontrata in campioni di soggetti normali ma sostanzialmente paragonabile a quella di campioni di SM provenienti da altre casistiche. Il dato più importante è che nessuno dei pazienti in esame ha sviluppato sintomi o segni indicativi di PML nel corso della terapia con Natalizumab. Inoltre, tra i pazienti positivi basalmente i livelli di JCV DNA nelle urine non hanno mostrato incrementi, e nessuno dei pazienti negativi basalmente ha mostrato positivizzazione. Da sottolineare che la sensibilità delle metodiche da noi utilizzate per la rilevazione del DNA era di 2 copie/ml, ovvero circa 20 volte superiore ai kit commerciali normalmente in uso (ViraCor). I nostri risultati sono in linea con quelli dei

pochi altri studi sull'argomento e fanno pensare che Natalizumab non influenzi significativamente l'andamento dei livelli di JCV DNA. Coerente con tali considerazioni è il fatto che non si sia riscontrata nel nostro gruppo di pazienti positività per il JCV DNA a livello del plasma I valori urinari di JCV non sembrano pertanto essere un buon *marker* per la diagnosi precoce di eventuale riattivazione del virus. Il fatto che un paziente nel corso del *follow up* sia andato incontro a una positivizzazione transitoria a livello delle PBMCs potrebbe indicare come il JCV possa essere riscontrato, senza che vi sia alcun correlato patologico, non solo nelle urine ma anche a livello delle cellule mononucleate del sangue periferico, rendendo il dosaggio del JCV DNA in questa sede e a livello del plasma poco indicativo di riattivazione virale e PML.

Nell'ambito della nostra ricerca non ci siamo limitati alla valutazione di JCV, ma abbiamo eseguito anche i dosaggi urinari del BKV DNA, il che rappresenta un aspetto assolutamente originale, non esistendo al momento analoghe valutazioni in studi condotti nello stesso campo. Il BK virus è un poliomavirus dalla struttura molto simile al JCV che ha un ruolo nello sviluppo di patologie principalmente a livello renale nei pazienti sottoposti a trapianti di rene o di midollo osseo. La prevalenza del BKV DNA nel nostro gruppo di pazienti era di circa il 20%. Nel gruppo di 33 pazienti si è notato un aumento della concentrazione urinaria di BKV. Mettendo a confronto i livelli di BKV DNA a T0 e T12 nel gruppo di pazienti che ha raggiunto i 12 mesi di *follow up* si è infatti riscontrato un incremento del valore (da 4.1 a 6.3 [log(copie/ml)] $p=0.285$). Benché la variazione non sia risultata significativa (ma dobbiamo considerare il piccolo numero di osservazioni) essa deve a nostro avviso richiamare attenzione, anche in considerazione del fatto che uno dei pazienti basalmente negativo, si è positivizzato per BKV nel corso del trattamento con Natalizumab. In particolare, questi risultati potrebbero suggerire che l'incremento di concentrazione (o la positivizzazione) del BKV DNA a livello delle urine durante il trattamento con Natalizumab possano essere indicatori della ridotta sorveglianza immunologica verso il BK, i poliomavirus in generale e, possibilmente, anche del JCV (magari in tempi più lunghi rispetto a quelli della nostra osservazione).

Riguardo ai dati ottenuti sui dosaggi ematici dei globuli bianchi, è interessante notare che, nonostante non sia stato individuato un trend di incremento dei globuli bianchi nel gruppo globale di 33 pazienti, il numero medio di globuli bianchi è aumentato significativamente nel sottogruppo di 15 pazienti che ha raggiunto i 12 mesi di trattamento, passando da un valore medio basale di 7.2 ad un valore medio di 8.9 ($p=0.021$), in linea con i risultati riscontrati in precedenti studi. Ciò confermerebbe l'ipotesi secondo la quale Natalizumab possa bloccare anche le alfa-integrine presenti a livello del midollo osseo e della milza, favorendo l'aumento del numero dei linfociti circolanti. In conclusione, i nostri dati confermano l'estrema efficacia, il profilo di sicurezza e la buona tollerabilità della terapia con Natalizumab nei pazienti con SM, e mostrano come i dosaggi urinari e plasmatici di JCV DNA non costituiscano un buon marker per la riattivazione del JC e lo sviluppo di PML. Peraltro, i dosaggi urinari e sierici del JCV sembrano avere scarsa affidabilità, almeno utilizzando le metodiche attualmente disponibili.

Un ulteriore approfondimento meriterà invece la valutazione del BKV DNA urinario come indicatore di ridotta immunosorveglianza e come possibile strumento indiretto di diagnosi precoce di riattivazione del JCV.

Tabelle e figure

Tabella 1. Caratteristiche basali dei pazienti trattati con Natalizumab (n=15) con un follow up di almeno 12 mesi.

| | |
|--|------------------------|
| <i>Età in anni (media e DS)</i> | 38.7 (10.2) |
| <i>Età all'esordio dei sintomi in anni (media e DS)</i> | 27.7 (8.9) |
| <i>Sesso (n e %)</i> | |
| Maschi | 5 (33.3%) |
| Femmine | 10 (66.7%) |
| <i>EDSS (media e DS); (mediana e RIQ)</i> | 3.2 (1.4); 3.5 (2-4) |
| <i>EDSS (n e %)</i> | |
| 0-1.5 (media e DS) | 2 (13.3%) |
| 2-2.5 (media e DS) | 5 (33.3%) |
| 3-3.5 (media e DS) | 1 (6.7%) |
| 4-4.5 (media e DS) | 5 (33.3%) |
| 5-6 (media e DS) | 2 (13.3%) |
| <i>N° ricadute anno precedente (media e DS); (mediana e RIQ)</i> | 2.3 (1.4); 2 (1.0-2.0) |

Tabella 2. Valutazione virologica basale per JCV dei pazienti trattati con Natalizumab (n=33).

| | |
|--|--------------------------|
| <i>Positività a JCV a T0 (n e %)</i> | 14 (42.4%) |
| <i>DNA JCV nei pazienti positivi a T0 in log(copie/ml) (media e DS); (mediana e RIQ)</i> | 7.3 (2.4); 7.9 (6.3-8.5) |

Tabella 3. Valutazione virologica basale per BKV dei pazienti trattati con Natalizumab (n=33).

| | |
|--|--------------------------|
| <i>Positività a BKV a T0 (n e %)</i> | 6 (20.0%) |
| <i>DNA BKV nei pazienti positivi a T0 in log(copie/ml) (media e DS); (mediana e RIQ)</i> | 4.2 (1.1); 4.2 (3.3-4.7) |

Tabella 4. Livelli basali e dopo 12 mesi di JCV DNA in 6 pazienti trattati con Natalizumab (p=0.917).

| | |
|--|--------------------------|
| <i>DNA JCV in 6 pazienti positivi a T0 in log(copie/ml) (media e DS); (mediana e RIQ)</i> | 6.4 (3.1); 7.4 (6.0-8.2) |
| <i>DNA JCV in 6 pazienti positivi a T12 in log(copie/ml) (media e DS); (mediana e RIQ)</i> | 7.8 (1.2); 7.8 (6.9-9.3) |

Tabella 5. Confronto dosaggi di BKV DNA tra basale e dopo dodici mesi di trattamento con Natalizumab (p=0.285).

| | |
|--|--------------------------|
| <i>DNA BKV in 3 pazienti positivi a T0 in log(copie/ml) (media e DS); (mediana e RIQ)</i> | 4.1 (1.6); 3.3 (2.9-5.9) |
| <i>DNA JCV in 4 pazienti positivi a T12 in log(copie/ml) (media e DS); (mediana e RIQ)</i> | 6.3 (2.0); 5.6 (5.1-7.4) |

Tabella 6. Confronto dei i valori di WBC tra basale e dopo dodici mesi di trattamento con Natalizumab (p=0.021).

| | |
|---|---------------------------|
| <i>WBC x10³ in 15 pazienti a T0 (media e DS); (mediana e RIQ)</i> | 7.2 (1.7); 7.5 (5.9-8.6) |
| <i>WBC x10³ in 15 pazienti a T12 (media e DS); (mediana e RIQ)</i> | 8.9 (7.5); 8.2 (7.5-11.2) |

Tabella 7. Numero di ricadute nell'anno precedente all'inizio della terapia e dopo 12 mesi di trattamento (p=0.0027).

| | |
|---|--------------------|
| <i>N ricadute anno precedente (media e DS); (mediana e RIQ)</i> | 2.3 (1.4); 2 (1-2) |
| <i>N ricadute 1 anno di terapia (media e DS); (mediana e RIQ)</i> | 0.5 (0.9); 0 (0-1) |

Tabella 8. Disabilità neurologica (espressa come punteggio EDSS) al basale e dopo 12 mesi di trattamento per soggetti trattati con Natalizumab (p=0.110).

| | |
|---|------------------------|
| <i>EDSS a T0 (media e DS); (mediana e RIQ)</i> | 3.2 (1.4); 3.5 (2-4) |
| <i>EDSS a T12 (media e DS); (mediana e RIQ)</i> | 2.7 (1.6); 2.5 (1.5-4) |

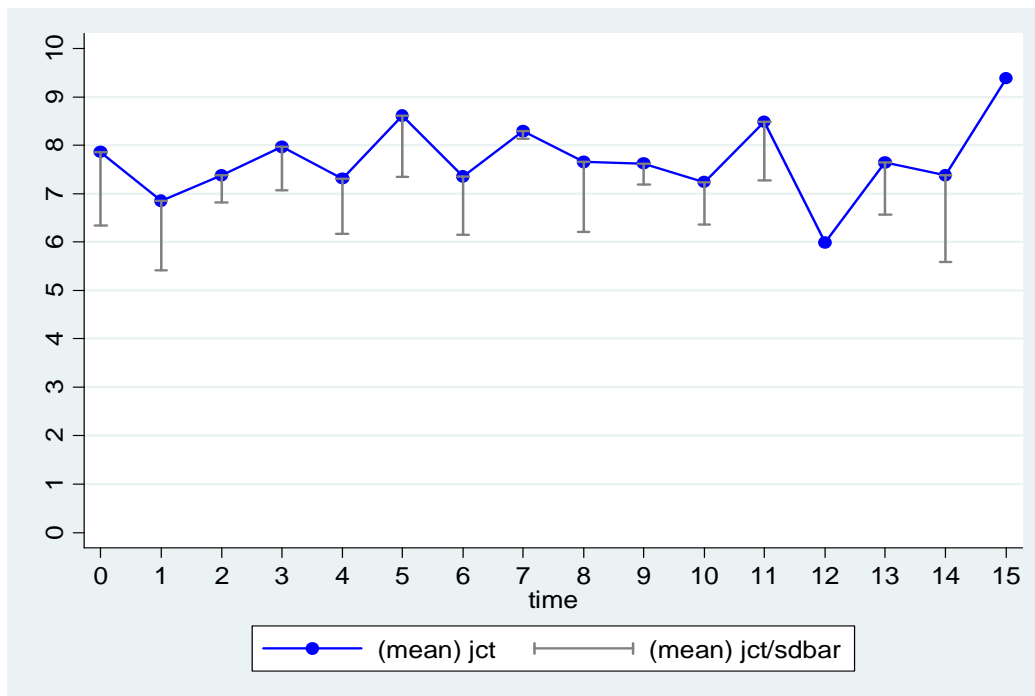


Figura 1. Curva valori medi di JCV DNA nei soggetti positivi alla rilevazione basale.

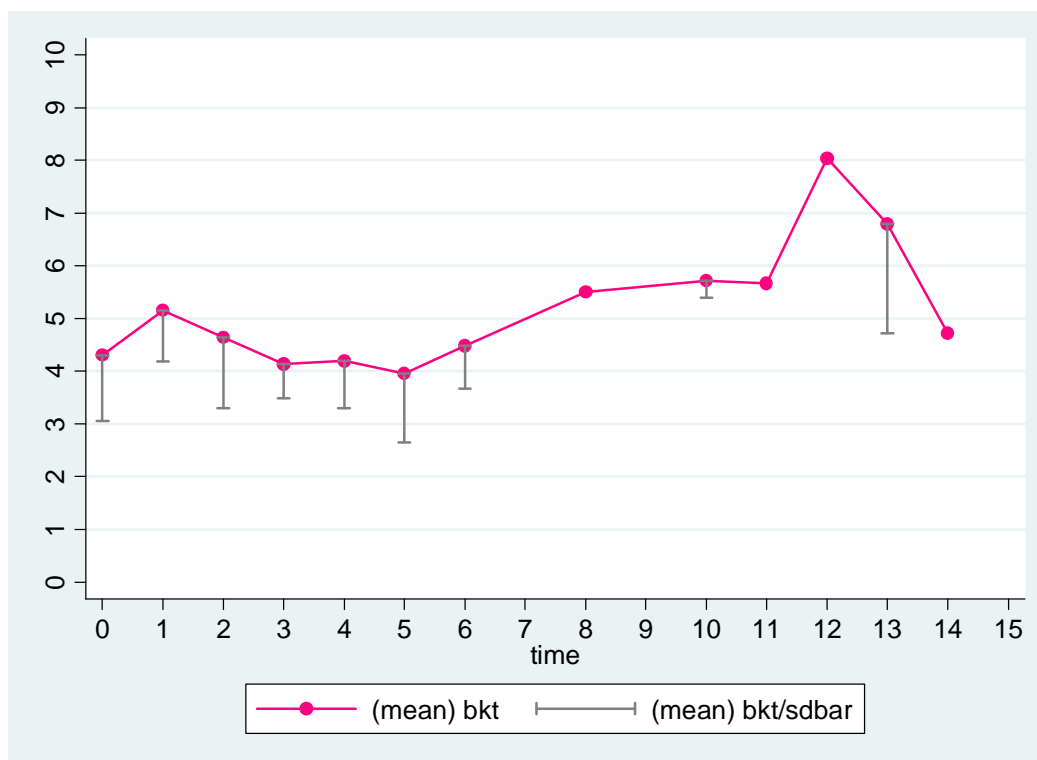


Figura 2: Curva valori medi di BK per i soggetti positivi a BKV.

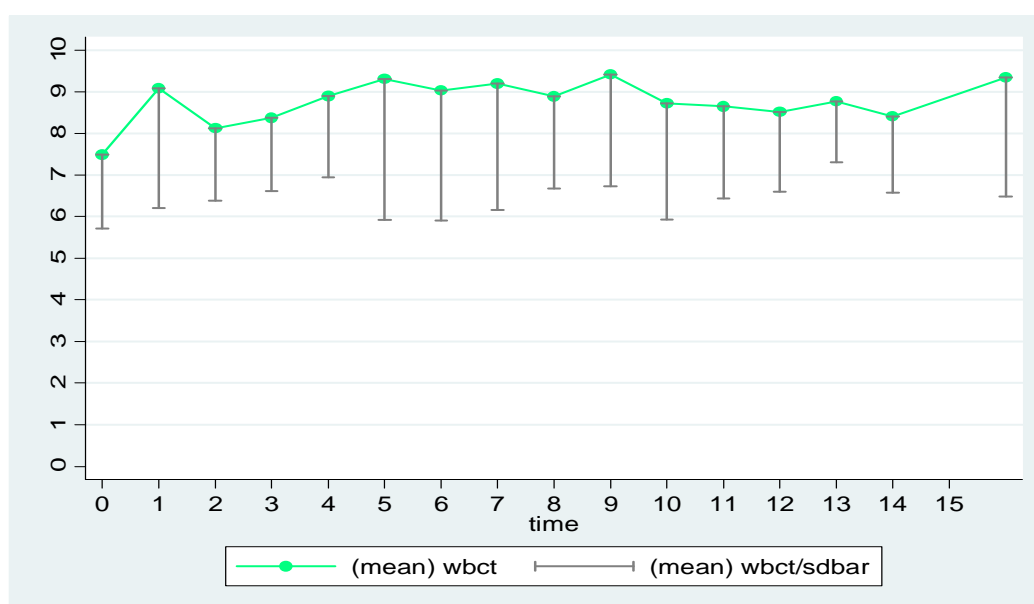


Figura 3. Trend temporale del dosaggio di WBC relativo a tutti i pazienti arruolati nello studio.

Bibliografia

1. Uccelli A, Giunti D, Capello E et al. EAE in the common marmoset *Callithrix jacchus*. *Int MS J* 2003;1:106-112.
2. Durelli L, Cocito D, Riccio A et al. High dose intravenous methylprednisolone in the treatment of multiple sclerosis: clinical-immunologic correlations. *Neurol* 1986;36:238-243.

3. Milligan NM, Newcombe R, Compston DA. A double blind controlled trial of high dose methylprednisolone in patients with multiple sclerosis. Clinical effects. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1987; 50:511-516.
4. US Food and Drug Administration Summary basis for approval of Avonex®, Cambridge 1995.
5. PRISMS (Prevention of Relapses and disability by Inteferon β 1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. Randomized, double-blind placebo-controlled study of interferon β 1a in relapsing/remitting MS. *Lancet* 1998;352:498-504.
6. Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L et al. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Experim Med* 1999;189:865-870.
7. Edan G, Miller D, Clanet M et al. Therapeutic effect of novantrone combined with methylprednisolone in multiple sclerosis: a randomized multicentre study of active disease using MRI and clinical criteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;62:112-118.
8. Elices MJ, Osborn L, Takada Y et al. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 1990;60:577-584.
9. Carlos TM, Schwartz BR, Kovach NL et al. Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells. *Blood* 1990;76:965-970.
10. Miller DH, Khan OA, Sheremata WA et al. A controlled trial of Natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2003;348(1):15-23.
11. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E et al. A randomized, placebo-controlled trial of Natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006;354(9):899-910.
12. Rudick RA, Stuart WH, Calabresi PA et al. Natalizumab plus interferon β -1a for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006;354(9):911-923.
13. Report di BIOGEN IDEC.
14. Zu Rhein GM. Polyoma-like virions in a human demyelinating disease. *Acta Neuropathol* 1967;8:57-68.
15. Cavanagh IB, Greenbaum D, Marshall AB et al. Cerebral demyelination associated with disorders of the reticuloendothelial system. *Lancet* 1959;2:524-529.
16. Fields virology 4th ed. *Lippincott*, New York 2001.
17. American Academy of Neurology, Toronto 2010.
18. Weber F, Goldmann C, Kramer M et al. Evaluation of the incidence of anti JCV Antibodies in a Cohort of Natalizumab- Treated MS patients. Cellular and humoral immune response in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol* 2001;49:636-642.
19. Krumboltz M, Meinel I, Kumpfel T. Natalizumab disproportionately increases circulating pre-B and B cells in multiple sclerosis. *Neurology* 2008;71:1350-1354.
20. Berger JR. Natalizumab and progressive multifocal leucoencephalopathy. *Ann Rheum Dis* 2006;65(suppl. 3):iii48-53.
21. Chen Y, Bord E, Tompkins T et al. Asymptomatic reactivation of JC virus in patients treated with Natalizumab. *N Eng J Med* 2009;361:1067-1074.
22. Rinaldi L, Rinaldi F, Perini P et al. No evidence of JC virus reactivation in Natalizumab treated multiple sclerosis patients: a 18 month follow-up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010; in press.
23. Rudick R, Solon OH, O'Connor P et al. Effects of Natalizumab Treatment on the Presence of JC Virus DNA in Blood or Urine in Multiple Sclerosis Patients. *American Academy of Neurology Annual Meeting*. April 2010. Toronto, Canada.