

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102020000007357
Data Deposito	07/04/2020
Data Pubblicazione	07/10/2021

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	Q	1	70

Titolo

Metodo per il rilevamento e la quantificazione di citomegalovirus umano attraverso RNA virionici.

"Metodo per il rilevamento e la quantificazione di citomegalovirus umano attraverso RNA virionici".

DESCRIZIONE

Il presente trovato ha come oggetto un metodo per il rilevamento e/o la quantificazione di citomegalovirus umano (hCMV) in un campione prelevato da un paziente, nonché primer, sonde e kit utili in tale metodo.

Nonostante i progressi nella pratica clinica e nelle strategie di trattamento, l'infezione da hCMV rappresenta ancora un problema significativo soprattutto nell'ambito dei trapianti, in quanto è in grado di influenzare fortemente il risultato del trapianto, sia nel trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) (Azevedo et al., Clinics 2015; 70(7):515-523) che nel trapianto di organi solidi (SOT) (Andrews et al., Transplantation 2011; 92(11):1181-7). Ciò è principalmente causato dalla combinazione di una elevata prevalenza di hCMV tra la popolazione (Bate et al., Clin Infect Dis. 2010; 50(11):1439-47; Beam et al., Curr Infect Dis Rep. 2012; 14(6):633-41) e di terapie di immuno-soppressione

post-trapianto che espongono i pazienti ad un aumentato rischio di sviluppare gravi malattie da hCMV, sia a livello di organo che a livello sistematico, e può essere associata anche a rigetto del trapianto (Torre-Cisneros et al., Clin Infect Dis. 2009; 49(8):1167-8; Crough et al., Clin Microbiol Rev. 2009; 22(1):76-98).

Oggigiorno, la necessaria gestione dell'infezione da hCMV è attuata essenzialmente con due strategie diverse ma correlate: terapia preventiva (o terapia preemptive) e profilassi universale (Andrews et al., Transplantation 2011; 92(11):1181-7; Emery et al., 2013 Br J Haematol. 2013; 162(1):25-39; Kotton et al., Transplantation 2013; 96(4):333-60). La profilassi universale consiste nel somministrare a tutti i pazienti un agente antivirale (come ad esempio ganciclovir o valganciclovir) per un certo periodo dopo il trapianto. La terapia preemptive consiste nel trattare solo i pazienti con infezione e solo al di sopra di una certa carica virale che era definita inizialmente attraverso metodiche di coltura virale (viremia), quindi di

immunofluorescenza sulle cellule bianche del sangue (antigenemia) e attualmente mediante tecniche di biologia molecolare (tecnologie di amplificazione degli acidi nucleici). Entrambi gli approcci si basano sulla somministrazione di farmaci che inibiscono il meccanismo di replicazione del DNA. Nel corso di trattamenti, il monitoraggio della carica virale mediante quantificazione del DNA di hCMV (DNAemia) nel sangue intero o nel plasma attraverso la reazione a catena della polimerasi in tempo reale è stato riconosciuto come la migliore pratica clinica e come tale è raccomandato e approvato in diverse linee guida internazionali correnti questi (Kotton et al., Transplantation 2018; 102(6):900-931, Griffiths et al., PLoS One. 2016; 11(9):e0163722, Emery et al., 2013 Br J Haematol. 2013; 162(1):25-39). Il monitoraggio della DNAemia attraverso la PCR in tempo reale (Real-time PCR) si basa sull'applicazione di soglie di riferimento della quantità di DNA di hCMV per un intervento clinico e sulla descrizione della cinetica di replicazione del hCMV. I metodi quantitativi di PCR in tempo

reale permettono di ottenere una quantificazione accurata e precisa del DNA virale in un ampio intervallo di misurazione.

Gli attuali farmaci antivirali, tra cui ganciclovir, aciclovir, valganciclovir, valaciclovir, foscarnet e cidofovir, hanno dimostrato di essere molto efficaci nel trattamento di infezioni da hCMV (McIntosh et al., J Virus Erad. 2016; 2(3):143-8, Emery et al., 2013 Br J Haematol. 2013; 162(1):25-39, Ljungman et al., Hematol Oncol Clin North Am. 2011; 25(1):151-69), ma comportano un'elevata tossicità. Inoltre, l'esposizione prolungata a bassi dosaggi può indurre lo sviluppo di ceppi di hCMV farmaco resistenti. Di conseguenza, sono stati studiati nuovi farmaci più efficaci e meno tossici per limitare l'esposizione dei pazienti ai noti effetti farmacologici avversi. Fra questi sono stati valutati inibitori del complesso della terminasi, fra i quali si è dimostrato particolarmente efficace il letermovir (Lischka et al., Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(3):1290-7; Goldner et al., J. Virol. 2011;

85(20):10884-93; Chemaly et al., J Virol. 2011; 85(20):10884-93, Mendelez et al., Infect Drug Resist. 2015; 8:269-77), che ha ricevuto l'approvazione per i pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) (Marty et al., N Engl J Med. 2017; 377(25):2433-2444). I risultati preliminari degli studi di fase II ne incoraggiano anche l'uso nei destinatari di trapianto da organi solidi (SOT) (Stoelben et al., Transpl Int. 2014; 27(1):77-864). Letermovir è un agente antivirale che inibisce la maturazione del DNA di hCMV in singoli genomi, ma non interferisce con la replicazione del DNA virale. Infatti, letermovir si lega ai componenti del complesso della terminasi (UL51, UL56 e UL89) e blocca il taglio del concatamero del DNA causando l'accumulo di DNA di hCMV nelle cellule infette che vanno poi incontro a morte per apoptosis. Una conseguenza dell'accumulo di DNA di hCMV nei pazienti trattati con letermovir è che i metodi attuali di monitoraggio della carica virale basati sul rilevamento e la quantificazione del DNA di hCMV e sul confronto con le soglie di

riferimento non sono più adeguati per monitorare la viremia nel follow-up post-trapianto (Bowman et al., Expert Opin Investig Drugs. 2017; 26(2):235-241). In questa situazione il monitoraggio della carica di hCMV dovrebbe tornare ad essere eseguito con la viremia, il metodo colturale per individuare le particelle virali infettive presenti nel campione del paziente. Questo metodo diagnostico è stato però abbandonato per la sua complessità di esecuzione e di interpretazione a confronto con la PCR in tempo reale.

Un target alternativo al DNA di hCMV per il monitoraggio dei pazienti e in particolare quelli immunodepressi o immunosoppressi trattati con i suddetti nuovi farmaci come il letermovir potrebbe essere l'RNA messaggero (mRNA) di hCMV. Infatti, fin dalle prime fasi dell'infezione da hCMV, compaiono nelle cellule infettate RNA messaggeri trascritti a partire dal genoma virale. È stato inoltre dimostrato che diversi mRNA virali sono incorporati nel virione (Bresnahan et al., Science 2000; 288(5475): 2373-6, Greijer et al., J. Virol. 2000; 74(19): 9078-82, Terhune et al., J. Virol.

2004; 78(19): 10390-8).

L'mRNA di hCMV contenuto nelle cellule infette è stato in precedenza direttamente correlato all'insorgenza di infezione attiva a partire dall'analisi di campioni di sangue intero periferico o midollare contenenti cellule bianche infettate dal virus. Tra i trascritti virali, gli mRNA precoci immediati (mRNA IE), codificati ad esempio dal gene UL123, sono rilevanti per la fase iniziale dell'infezione. In ultima analisi, l'aumento di mRNA IE è correlato alla progressione dell'infezione e richiede un'attenta valutazione clinica (Greijer et al., J Clin Virol. 2002; 24(1-2):57-66). La presenza di mRNA tardivi (late) come quello per la proteina pp67 indica invece lo stadio finale di un'infezione produttiva che necessita un immediato trattamento antivirale. Tale monitoraggio del livello di mRNA è stato effettuato utilizzando una tecnologia di amplificazione denominata "Nucleic Acid Sequence Based Amplification" (NASBA) in campioni di sangue intero, che ha dimostrato una sensibilità di circa 10⁴ copie/mL di RNA e una riproducibile linearità

in un intervallo di misurazione compreso fra 104 e 107 copie/mL (Greijer et al., J Clin Virol. 2002; 24(1-2):57-66).

Diversi RNA di hCMV sono stati studiati come target in pazienti HSCT e SOT sotto trattamento con ganciclovir e foscarnet. Sempre utilizzando la NASBA su campioni di sangue intero, il solo mRNA IE ha mostrato una specificità e una cinetica paragonabile alla DNAemia di hCMV (Gerna et al., Int J Antimicrob Agents. 2000; 16(4):455-60). Inoltre, mRNA IE rispetto ad altri target correla in modo più affidabile con un'infezione attiva in associazione ai trattamenti antivirali (Gerna et al., Blood 2003; 101(12):5053-60). Infatti, il DNA può essere rilevato anche in assenza di infezione attiva mentre proteine come la pp65 possono accumularsi anche con gli attuali trattamenti basati su inibitori della polimerasi di hCMV (ad es. ganciclovir, foscarnet, valganciclovir) che non interferiscono con la sintesi proteica.

Tuttavia, i metodi finora presentati che usano mRNA virale come target sono stati applicati a campioni di sangue intero (cioè cellulari) con lo

scopo di rilevare mRNA virale contenuto nelle cellule bianche. Questi metodi non sono perciò rivolti al monitoraggio dell'hCMV circolante che è l'indicatore più specifico dell'infezione attiva da hCMV.

Resta pertanto la necessità di nuovi metodi quantitativi per il rilevamento di hCMV in pazienti in trattamento con antivirali che causano l'accumulo del DNA virale (quali ad esempio gli inibitori del complesso della terminasi virale come il letermovir) che abbiamo una sensibilità paragonabile a quella ottenuta con i metodi attuali che utilizzano il DNA genomico di hCMV come target, ma al contempo non subiscano interferenza da parte dello stesso DNA genomico di hCMV.

A fronte delle limitazioni dell'arte nota sopra descritte, compito precipuo del presente trovato è quello di fornire un metodo per il rilevamento e/o la quantificazione di citomegalovirus umano (hCMV) come particelle virali circolanti (virioni) in un campione prelevato da un paziente, in particolare se

immunodepresso o immunosoppresso, in trattamento con un farmaco antivirale capace di interferire con il taglio e l'incapsidazione del DNA genomico di hCMV.

Nell'ambito di questo compito, uno scopo del trovato è quello di fornire un metodo per il rilevamento e/o la quantificazione di citomegalovirus umano (hCMV) basato su RNA virale incorporato nella particella virale circolante avente una sensibilità paragonabile a quella ottenuta con i metodi basati sul DNA genomico virale nei pazienti immunodepressi o immunosoppressi trattati con gli antivirali impiegati finora ed una specificità superiore perché in grado di non subire interferenze da parte del DNA genomico di hCMV in forma libera circolante (risultante dalla lisi delle cellule infettate dal virus).

Altro scopo del presente trovato è quello di fornire oligonucleotidi specifici per mRNA virionici associati con l'infezione attiva da hCMV.

Il presente trovato si prefigge inoltre lo

scopo di fornire un kit per il rilevamento e/o la quantificazione di hCMV in grado di fornire al clinico un'informazione diagnostica sulla presenza di virioni circolanti con tutti i vantaggi delle metodiche di biologia molecolare (tecnologie di amplificazione degli acidi nucleici).

Questo compito, nonché questi ed altri scopi che meglio appariranno in seguito, sono raggiunti da un metodo per il rilevamento e/o la quantificazione di un mRNA virionario di citomegalovirus umano (hCMV) in un campione prelevato da un paziente trattato con un farmaco antivirale capace di interferire con il taglio e l'incapsidazione del DNA di hCMV, detto metodo comprendente i passaggi di:

- i) opzionalmente rimuovere dal campione prelevato dal paziente ogni componente cellulare eventualmente presente, ottenendo un campione privo di cellule;
- ii) estrarre RNA da un campione privo di cellule prelevato dal paziente o dal campione privo di cellule ottenuto a seguito del passaggio i);

iii) formare una miscela di reazione mettendo a contatto detto RNA estratto a seguito del passaggio ii) con una soluzione comprendente:

a) una o più coppie di primer specifici per detto mRNA virionario di hCMV;

b) una DNA polimerasi RNA-dipendente;

c) una DNA polimerasi;

iv) sottoporre detta miscela di reazione a un processo di retrotrascrizione in condizioni tali da generare un cDNA corrispondente a detto mRNA virionario di hCMV;

v) Sottoporre detto cDNA a un processo di amplificazione del DNA in condizioni tali da generare almeno un prodotto di amplificazione costituito da DNA;

vi) rilevare la presenza e/o quantificare la quantità di detto almeno un prodotto di amplificazione costituito da DNA, come indicazione della presenza e/o della quantità di mRNA virionario di hCMV nel campione prelevato dal paziente.

Gli scopi del presente trovato sono raggiunti anche da un oligonucleotide costituito da una

sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 1-116.

Gli scopi del presente trovato sono raggiunti infine anche da un kit per il rilevamento e/o la quantificazione di mRNA virionario di hCMV comprendente:

a) almeno una coppia di primer selezionata tra:

- una coppia di primer di un primo set ("set 1") in cui un primo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 1-12 e un secondo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 13-45; o

- una coppia di primer di un secondo set ("set 2") in cui un primo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 50-71 e un secondo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 72-84; o

- una coppia di primer di un terzo set ("set 3") in cui un primo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da

SEQ ID NOS: 92-105 e un secondo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da

SEQ ID NOS: 106-111; e

opzionalmente

b) una DNA polimerasi RNA-dipendente; e

c) una DNA polimerasi.

Ulteriori caratteristiche e vantaggi del trovato risulteranno maggiormente dalla seguente descrizione dettagliata.

Nella descrizione e nelle rivendicazioni si applicano le seguenti definizioni.

Un "processo di amplificazione" si riferisce a qualsiasi reazione chimica, incluse quelle enzimatiche, che danno luogo all'incremento di copie di una sequenza di DNA. Un metodo per l'amplificazione del DNA è la reazione a catena della polimerasi (PCR), che è ben nota al tecnico del ramo e descritta ad esempio nel brevetto no. US 4,683,202. Ulteriori reazioni di amplificazione comprendono, tra le altre, la reazione a catena della ligasi (LCR), la reazione a catena di polimerasi e ligasi (PLCR), la Gap-LCR, la Strand Displacement Amplification (SDA), la Rolling

Circle Amplification (RCA) e la loop-mediated isothermal amplification (LAMP).

Il termine "oligonucleotide" si riferisce a molecole comprendenti due o più desossiribonucleotidi o ribonucleotidi, quali ad esempio primer, sonde, frammenti di acidi nucleici da rilevare e acidi nucleici di controllo. Gli oligonucleotidi possono essere preparati mediante qualsiasi idoneo metodo noto nell'arte, comprese ad esempio clonazione e restrizione di sequenze opportune e sintesi chimica diretta, quale la convenzionale e ben nota chimica delle fosforoamiditi. Nel contesto della presente invenzione, gli oligonucleotidi possono essere chimicamente modificati, cioè il primer e/o la sonda possono comprendere uno o più nucleotidi modificati o composti non-nucleotidici.

Il termine "primer" viene qui usato come noto al tecnico del ramo e fa riferimento a oligonucleotidi naturali o sintetici in grado di fungere da punto di inizio della sintesi del DNA nelle condizioni in cui viene indotta la sintesi di un prodotto di estensione del primer

complementare ad un filamento di acido nucleico, cioè in presenza di quattro differenti nucleosidi trifosfato e di un agente di polimerizzazione (quale ad esempio un enzima DNA polimerasi o trascrittasi inversa) in un opportuno tampone e ad un'idonea temperatura.

Il termine "sonda" si riferisce a oligonucleotidi naturali o sintetici in grado di ibridare nelle opportune condizioni ad un prodotto di amplificazione di un acido nucleico, allo scopo di rilevare quel prodotto di amplificazione.

Il termine "campione" si riferisce ad un materiale prelevato da un paziente umano, in particolare un paziente umano trattato con un farmaco antivirale capace di interferire con il taglio e l'incapsidazione del DNA di hCMV, e che si sospetta contenere o potenzialmente contiene almeno un mRNA virionario di citomegalovirus umano (hCMV).

Il termine "componente cellulare" si riferisce alla parte corpuscolata costituita da cellule o frammenti di cellule che può essere presente in un campione prelevato da un paziente.

In un primo aspetto il presente trovato si riferisce a un metodo per il rilevamento e/o la quantificazione di un mRNA virionico di citomegalovirus umano (hCMV) in un campione prelevato da un paziente trattato con un farmaco antivirale capace di interferire con il taglio e l'incapsidazione del DNA di hCMV, detto metodo comprendente i passaggi di:

- i) opzionalmente rimuovere dal campione prelevato dal paziente ogni componente cellulare eventualmente presente, ottenendo un campione privo di cellule;
- ii) estrarre RNA da un campione privo di cellule prelevato dal paziente o dal campione privo di cellule ottenuto a seguito del passaggio i);
- iii) formare una miscela di reazione mettendo a contatto detto RNA estratto a seguito del passaggio ii) con una soluzione comprendente:
 - a) una o più coppie di primer specifici per detto mRNA virionico di hCMV;
 - b) una DNA polimerasi RNA-dipendente;
 - c) una DNA polimerasi;

iv) sottoporre detta miscela di reazione a un processo di retrotrascrizione in condizioni tali da generare un cDNA corrispondente a detto mRNA virionario di hCMV;

v) sottoporre detto cDNA a un processo di amplificazione in condizioni tali da generare un prodotto di amplificazione costituito da DNA;

vi) rilevare la presenza e/o quantificare la quantità di detto almeno un prodotto di amplificazione costituito da DNA, come indicazione della presenza e/o della quantità di mRNA virionario di hCMV nel campione prelevato dal paziente.

In una forma di realizzazione del metodo secondo il trovato, il paziente è immunodepresso o immunosoppresso.

Qualora il campione prelevato dal paziente non sia a monte privo di cellule, il metodo del trovato prevede un primo passaggio volto all'ottenimento di un campione privo di cellule, al fine di poter focalizzare l'analisi sul solo mRNA virionario trascritto dal genoma di hCMV e trasportato dai virioni. Il campione può quindi

essere un campione clinico acellulare oppure, come ad esempio nel caso di sangue intero, subire un trattamento (passaggio (i) del metodo dell'invenzione) per rimuovere la componente cellulare. I metodi per rimuovere da campioni clinici le cellule di cui è costituita la componente cellulare sono noti al tecnico del ramo e comprendono, ad esempio, la centrifugazione del sangue intero per ottenere plasma, la coagulazione del sangue intero per ottenere siero, la centrifugazione dei lavaggi bronco-alveolari per ottenere un surnatante e altri.

Preferibilmente, il campione prelevato dal paziente è selezionato dal gruppo costituito da plasma (opzionalmente contenente un anticoagulante), siero, urina, saliva, surnatante di un tampone boccale, liquido cefalorachidiano (CSF), lavaggi bronco-alveolari (BAL), lavaggi naso-faringei, aspirati naso-faringei, surnatante di tamponi faringei, liquido lacrimale, humor vitreo, surnatante di tamponi oculari, surnatante fecale.

Preferibilmente l'mRNA virionario di hCMV è un

mRNA di un gene o di una regione codificante (ORF o CDS) di hCMV scelto dal gruppo costituito da UL21.5 (SEQ ID NO: 117), UL65 (SEQ ID NO: 122), UL83 (SEQ ID NO: 123), UL106 (SEQ ID NO: 124), UL107 (SEQ ID NO: 125), UL108 (SEQ ID NO: 126), UL109 (SEQ ID NO: 127), UL110 (SEQ ID NO: 128), UL122 (SEQ ID NO: 129), UL123 (SEQ ID NO: 130), TRL/IRL2 (SEQ ID NO: 131), TRL/IRL3 (SEQ ID NO: 132), TRL/IRL4 (SEQ ID NO: 133), TRL/IRL5 (SEQ ID NO: 134), TRL/IRL7 (SEQ ID NO: 135), e TRL/IRL13 (SEQ ID NO: 136).

Per evitare o perlomeno limitare una reattività con DNA presente nel campione, i primer specifici per l'mRNA virionario di hCMV sono preferibilmente disegnati con la loro regione 5' complementare a un esone dell'mRNA, e la regione 3' complementare a un esone adiacente. In questo modo, è possibile ottenere primer che nelle condizioni di reazione possono ibridarsi solo a mRNA maturi, vale a dire a mRNA cui dopo la trascrizione sono stati rimossi gli introni e sono stati uniti gli esoni, o ai corrispondenti cDNA. Come esempio non limitativo, gli inventori del

presente trovato hanno disegnato primer specifici per l'mRNA del gene UL21.5 di hCMV (a cavallo della regione di giunzione degli esoni 1 e 2).

In una forma di realizzazione preferita del metodo secondo il trovato, ciascuna di detta una o più coppie di primer è indipendentemente selezionata tra:

una coppia di primer di un primo set ("set 1") in cui un primo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 1-12 e un secondo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 13-45; o

una coppia di primer di un secondo set ("set 2") in cui un primo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 50-71 e un secondo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 72-84.

In un'altra forma di realizzazione del metodo secondo il trovato, per limitare una reattività con DNA presenti nel campione si esegue una estrazione selettiva per l'RNA. In questa forma di

realizzazione, ciascuna di detta una o più coppie di primer, oltre che dai set 1) e set 2), può essere indipendentemente selezionata tra una coppia di primer di un terzo set ("set 3") in cui un primo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 92-105 e un secondo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 106-111.

In una forma di realizzazione preferita del metodo secondo il trovato, la miscela di reazione comprende ulteriormente una sonda, ovvero un oligonucleotide in grado di ibridare nelle condizioni di reazione del processo di amplificazione al prodotto di amplificazione costituito da DNA, allo scopo di permetterne il rilevamento e/o la quantificazione.

In una forma di realizzazione preferita del metodo secondo il trovato:

a) almeno una dell'una o più coppie di primer è una coppia di primer del set 1) e la miscela comprende ulteriormente una sonda avente una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 46-49; o

b) almeno una dell'una o più coppie di primer è una coppia di primer del set 2) e la miscela comprende ulteriormente una sonda avente una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 85-91; o

c) almeno una dell'una o più coppie di primer è una coppia di primer del set 3) e la miscela comprende ulteriormente una sonda avente una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 112-116.

I tre set di coppie di primer sopra descritti con i relativi tre gruppi di sonde permettono di rilevare tre regioni alternative della sequenza dell'mRNA del gene UL21.5 di hCMV. Come sarà chiaro al tecnico del ramo, ciascuna coppia di primer all'interno di un set sarà compatibile con le sonde che non presentano sovrapposizione di sequenza con i primer sullo stesso filamento del DNA o che presentano sovrapposizione con i primer sul filamento complementare per non più di 6 nucleotidi.

Per disegnare una sonda con caratteristiche ideali per la PCR, quali la sensibilità e la

specificità, uno o più nucleotidi della sonda possono essere sostituiti con corrispondenti analoghi nucleotidici. Si possono utilizzare diversi analoghi nucleotidici per ottenere le proprietà di appaiamento delle basi desiderate. Questi includono, fra gli altri, acidi peptidonucleici (PNA), morfolino, acidi glicolnucleici (GNA), acidi treonucleici (TNA), acidi xenonucleici (XNA) e acidi nucleici bloccati (LNA). Esistono inoltre modifiche volte a stabilizzare le sonde attraverso molecole che interagiscono con il doppio filamento del DNA.

Le sonde possono inoltre includere modificazioni adatte a rendere possibile la loro rilevazione direttamente (ad esempio fluorofori, quencher, complessi metallici, ecc.) o indirettamente (ad esempio biotina, digossigenina, sequenze linker, ecc.).

In una forma preferita, ma non limitativa, del presente trovato le sonde includono due modificazioni, rispettivamente un fluoroforo in posizione 5' e un quencher in posizione 3'. In una forma di realizzazione particolarmente preferita,

ma non limitativa, del trovato il fluoroforo è 6-FAM mentre il quencher è TAMRA.

Preferibilmente, la miscela di reazione comprende ulteriormente una coppia di primer e opzionalmente una sonda che sono specifici per una sequenza di controllo diversa dalla sequenza del target mRNA di hCMV. La suddetta sequenza di controllo viene preferibilmente aggiunta alla miscela di reazione in forma di acido nucleico esogeno, ad esempio un plasmide o un DNA sintetico o il genoma di un virus, di un batterio o di un batteriofago, al fine di costituire un "controllo interno" per valutare l'integrità degli acidi nucleici e l'assenza di inibitori di amplificazione nel campione testato.

In una forma di realizzazione preferita del metodo secondo il trovato, il processo di amplificazione è la reazione a catena della polimerasi (PCR).

Ancora più preferibilmente il processo di amplificazione è una PCR quantitativa di tipo Real-time.

In una forma di realizzazione preferita del

metodo secondo il trovato, il farmaco antivirale capace di interferire con il taglio e l'incapsidazione del DNA di hCMV è un inibitore del complesso della terminasi virale.

In una forma di realizzazione più preferita del metodo secondo il trovato, l'inibitore del complesso della terminasi virale è letermovir o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

In un altro aspetto, il presente trovato si riferisce a un oligonucleotide, specifico per mRNA del gene UL21.5 di hCMV, costituito da una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 1-116.

In una forma di realizzazione preferita, l'oligonuclotide secondo il trovato è un primer avente una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 1-45, SEQ ID NOS: 50-84, e SEQ ID NOS: 92-111.

In una forma di realizzazione preferita, l'oligonuclotide secondo il trovato è una sonda avente una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 46-49, SEQ ID NOS: 85-91, e SEQ ID NOS: 112-116.

Il presente trovato riguarda anche un kit per il rilevamento e/o la quantificazione di mRNA virionario di hCMV comprendente:

a) almeno una coppia di primer selezionata tra:

- una coppia di primer di un primo set ("set 1") in cui un primo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 1-12 e un secondo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 13-45; o

- una coppia di primer di un secondo set ("set 2") in cui un primo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 50-71 e un secondo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 72-84; o

- una coppia di primer di un terzo set ("set 3") in cui un primo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 92-105 e un secondo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 106-111; e

opzionalmente

- b) una DNA polimerasi RNA-dipendente;
- c) una DNA polimerasi.

In una forma di realizzazione preferita, il kit secondo il trovato comprende ulteriormente una sonda. Ad esempio, in tale forma di realizzazione del kit:

a) l'almeno una coppia di primer è una coppia di primer del set 1) e la sonda ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 46-49; o

b) l'almeno una coppia di primer è una coppia di primer del set 2) e la sonda ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 85-91; o

c) l'almeno una coppia di primer è una coppia di primer del set 3) e la sonda ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 112-116.

In una forma di realizzazione preferita, il kit secondo il trovato comprende ulteriormente una coppia di primer e opzionalmente una sonda specifici per una sequenza di controllo diversa

dalla sequenza del target mRNA di hCMV.

In una forma di realizzazione preferita del kit secondo il trovato la sequenza di controllo diversa dalla sequenza del target mRNA di hCMV è quella del batteriofago con genoma a RNA MS2, come ad esempio quella riportata nella banca dati di sequenze EBI ENA con il codice identificativo (ID) V00642 (versione 1 del 21 ottobre 1996).

Ad esempio, il kit secondo il trovato può comprendere una coppia di primer specifici per l'RNA genomico del fago MS2 aventi rispettivamente le sequenze di SEQ ID NO: 118 e SEQ ID NO: 119 ed una sonda avente la sequenza di SEQ ID NO: 120.

L'invenzione verrà ora ulteriormente descritta facendo riferimento al seguente esempio non limitativo.

ESEMPIO: estrazione non selettiva degli acidi nucleici (DNA+RNA) da 1 mL di plasma e amplificazione selettiva per l'mRNA del gene UL21.5 di hCMV

Questo esempio descrive un metodo per rilevare e/o quantificare l'mRNA del gene UL21.5 di hCMV in un campione non cellulare secondo quanto prevede

il trovato. Il test è stato eseguito per verificare l'efficienza di trascrizione inversa e di amplificazione, la specificità per l'mRNA del gene UL21.5 di hCMV e l'assenza di interferenza da parte delle sequenze corrispondenti del DNA genomico di hCMV.

Il metodo consiste nell'estrazione degli acidi nucleici del campione, retro-trascrizione/amplificazione/rilevazione. Tutte le fasi del metodo sono state effettuate automaticamente utilizzando uno strumento integrato modello ELITE InGenius® (ELITEchGroup S.p.A., codice INT030).

Preparazione dei campioni

Sono stati preparati campioni artificiali che simulano campioni clinici non cellulari mediante diluizione seriale di una coltura di hCMV, del ceppo Merlin (ATCC® VR-1590TM), in una matrice costituita da plasma raccolto in EDTA da donatori sani e testato negativo per il DNA di hCMV con un saggio diagnostico molecolare commerciale (CMV ELITE MGB® Kit, ELITEchGroup S.p.A., codice RTK015PLD).

La coltura di hCMV aveva una concentrazione di

5x10⁶ PFU (Plaque Forming Unit) di hCMV/mL. Lo stesso materiale è stato quantificato con un saggio diagnostico molecolare commerciale (CMV ELITE MGB® Kit, ELITEchGroup S.p.A., codice RTK015PLD) ed è risultato avere una concentrazione calcolata sul DNA genomico di circa 3x10⁸ Unità Internazionali (IU) di hCMV/mL.

Questa concentrazione in IU più elevata di quella in PFU era attesa in quanto la misurazione delle PFU rileva solo le particelle virali in grado di infettare le cellule mentre la misurazione delle copie di DNA genomico rileva anche le particelle virali non in grado di infettare, ma contenenti il DNA virale, e il DNA virale libero presente nel surnatante di coltura, come accade nei campioni di plasma dei pazienti con infezione attiva da hCMV in trattamento con farmaci antivirali che inibiscono il complesso della terminasi di hCMV come il letermovir.

I campioni simulati sono stati preparati mediante quattro diluizioni seriali della coltura di hCMV avente una concentrazione di 5x10⁶ PFU/mL (Plaque Forming Unit) di hCMV in plasma: 1:100,

1:1.000, 1:10.000, 1:100.000. Ciascun campione simulato è stato analizzato in doppio.

Estrazione degli acidi nucleici

Per ogni campione simulato in analisi, 1 mL di campione è stato trasferito in una provetta (Sonication Tube, fornita nel prodotto ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set, ELITechGroup S.p.A., codice INT032CS) e caricato nell'area campioni dello strumento ELITE InGenius®.

All'inizio della fase di estrazione, 10 μ L del prodotto CPE-Internal Control (ELITechGroup S.p.A., codice CTRCPE), una soluzione stabilizzata che fornisce il controllo interno esogeno di estrazione ed inibizione, sono stati dispensati automaticamente nella cartuccia di estrazione (fornita nel prodotto ELITE InGenius® SP 1000, ELITechGroup S.p.A., codice INT033SP1000) di ciascun campione. Il controllo interno è quindi processato insieme al campione per l'intera procedura di estrazione e di trascrizione inversa e PCR in tempo reale per dimostrare che il campione è stato processato in modo appropriato e che il risultato del saggio è valido. Il target

per il controllo interno è rappresentato dall'RNA genomico del batteriofago MS2, che non è correlato e non presenta omologie di sequenza con hCMV. La formulazione del controllo interno è pronta all'uso ed esso deve essere solo caricato dall'operatore nell'area reagenti dello strumento ELITE InGenius®.

Gli acidi nucleici dei campioni (DNA e RNA) sono stati estratti automaticamente dallo strumento ELITE InGenius® utilizzando il prodotto ELITE InGenius® SP1000 Extraction Kit (ELITechGroup S.p.A., codice INT033SP1000), che impiega agenti caotropici, proteasi, biglie magnetiche, soluzioni alcoliche e acqua per biologia molecolare per lisare il campione, catturare gli acidi nucleici, purificarli ed eluirli. Gli acidi nucleici sono stati eluiti in 100 µL di acqua per biologia molecolare.

Allestimento della reazione di trascrizione

inversa e amplificazione in tempo reale

Nella fase di allestimento della reazione, lo strumento ELITE InGenius®, per ciascun campione, ha trasferito 20 µL di miscela "CMV RNA PCR Mix"

(vedi Tabella 1) nel pozzetto della cassetta di PCR (fornita nel prodotto ELITE InGenius® PCR Cassette, ELITechGroup S.p.A., codice INT035PCR) collocata nel blocco termico.

In questo esempio, la CMV RNA PCR Mix contiene una coppia di primer specifici per l'mRNA del gene UL21.5 di hCMV selezionata dal "set 2" (SEQ ID NO: 52 e SEQ ID NO: 75) e la sonda compatibile avente SEQ ID NO: 87 modificata con 6-FAM in posizione 5' e TAMRA in posizione 3', in quanto disegnati a cavallo della giunzione tra gli esoni dell'mRNA del gene UL21.5 di hCMV e quindi selettivi per l'mRNA in un campione estratto in cui sono presenti sia il DNA sia l'RNA. La CMV RNA PCR Mix contiene anche primer specifici per l'RNA genomico del fago MS2 (SEQ ID NO 118 e SEQ ID NO 119) e la relativa sonda (SEQ ID NO 120) modificata con 6-FAM in posizione 5' e TAMRA in posizione 3'.

Oltre ai primer e sonde di cui sopra, la miscela CMV RNA PCR Mix comprende inoltre nucleosidi trifosfato, cloruro di magnesio ed i seguenti reagenti:

Taq Buffer con KCl (Thermo Fisher Scientific, incluso nel prodotto Ref. EP0404) è un componente che stabilisce la forza ionica (potassio cloruro) e il pH (TRIS-HCl) ottimali e fornisce le sostanze necessarie per l'attività degli enzimi (detergenti).

RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Ref. EP0451) è una versione ricombinante dell'enzima del Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV). Questo enzima possiede attività DNA polimerasi RNA-dipendente e DNA-dipendente senza attività RNasi H. La stabilità termica è aumentata e può essere utilizzata per la sintesi del primo filamento di cDNA a temperature da 42 °C fino a 50 °C ottenendo una maggiore specificità.

Platinum® Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, Ref. EP0404) è una versione ricombinante dell'enzima DNA polimerasi del batterio *Thermus aquaticus* complessata con un anticorpo che blocca l'attività DNA polimerasica 5'→3' a temperatura ambiente e senza attività 3'→5' esonucleasica per ottenere una maggiore

processività (numero di nucleotidi aggiunti ad ogni legame). L'attività DNA polimerasica è ripristinata con una incubazione a 95 °C (hot start) ottenendo una maggiore specificità e sensibilità.

La formulazione della miscela CMV RNA PCR Mix è presentata nella Tabella 1.

TABELLA 1	
Formulazione della CMV RNA PCR Mix	
Componente	Concentrazione finale nella reazione di PCR
CMV UL21.5 Forward Primer (SEQ ID NO 52)	0,5 µM
CMV UL21.5 Reverse Primer (SEQ ID NO 75)	1,3 µM
CMV UL21.5 Sonda (SEQ ID NO 87)	0,2 µM
IC MS2 Forward Primer (SEQ ID NO 118)	0,05 µM
IC MS2 Reverse Primer (SEQ ID NO 119)	0,13 µM
IC MS2 Sonda (SEQ ID NO 120)	0,2 µM
dATP	0,2 mM
dCTP	0,2 mM

dGTP	0,2 mM
dTTP	0,2 mM
cloruro di magnesio	4 mM
Taq buffer con KCl	1X
RevertAid H Minus Reverse Transcriptase	3 Unità/ reazione
Platinum® Taq DNA polymerase	3 Unità/ reazione

Lo strumento ELITE InGenius® dispensa 10 µL degli acidi nucleici purificati dal campione nel pozzetto della cassetta di PCR, li mescola con la CMV RNA PCR Mix in modo da ottenere i 30 µL finali della reazione completa e sigilla il pozzetto con l'apposito tappo trasparente.

Reazione di trascrizione inversa e amplificazione

in tempo reale

Il blocco termico dello strumento ELITE InGenius® esegue il ciclo di trascrizione inversa e amplificazione e il sistema ottico dello strumento rileva in tempo reale la fluorescenza nel pozzetto della cassetta di PCR attraverso il tappo trasparente.

Le condizioni del ciclo termico di trascrizione inversa e amplificazione del saggio

sono riportate nella Tabella 2.

TABELLA 2			
Condizioni del ciclo termico di RT-PCR			
Descrizione	Cicli	Temperatura	Durata
Trascrizione inversa	1	50 °C	1200 sec
Attivazione DNA polimerasi	1	95 °C	300 sec
Amplificazione (lettura fluorescenza)	45	95 °C	10 sec
		60 °C	35 sec

Interpretazione dei risultati

Alla fine del saggio, il software dello strumento ELITE InGenius® esegue automaticamente l'interpretazione dei risultati, seguendo regole prefissate, e la creazione dei rapporti di refertazione.

Il test ha richiesto il calcolo della curva standard di calibrazione del saggio per la quantificazione dei campioni con la PCR in tempo reale. Per il calcolo della curva standard sono state utilizzate quattro diluizioni seriali di un DNA plasmidico a titolo noto contenente clonata al suo interno una sequenza corrispondente a parte

del cDNA del gene UL21.5 di hCMV (SEQ ID NO:121).

Risultati

Il test ha prodotto i risultati riassunti nella Tabella 3.

TABELLA 3			
campione	parametro	Miscela completa di reazione (con trascrittasi inversa)	Miscela incompleta di reazione (senza trascrittasi inversa)
Linearità della serie di diluizioni	R ² Coeff. angolare	0,9980 -3,2660	- -
Diluizione del target 1:100 (5x10 ⁴ PFU di hCMV / mL) (3x10 ⁶ IU di hCMV / mL)	Copie di target/mL Target Ct	172563 25,13	- Non determinato
Diluizione del target 1:1.000 (5x10 ³ PFU di CMV / mL) (3x10 ⁵ IU di hCMV / mL)	Copie di target/mL Target Ct	17566 28,27	- Non determinato

Diluizione del target	Copie di target/mL	2130	-
1:10.000 (5x10 ² PFU di CMV / mL) (3x10 ⁴ IU di hCMV / mL)	Target Ct	31,17	Non determinato
Diluizione del target	Copie di target/mL	143	-
1:100.000 (5x10 ¹ PFU di CMV / mL) (3x10 ³ IU di hCMV / mL)	Target Ct	35,05	Non determinato

I dati in tabella 3 dimostrano che il metodo secondo il trovato permette di rilevare e quantificare l'mRNA virionico del gene UL21.5 di hCMV con la correlazione lineare tipica dei saggi molecolari basati sulla quantificazione del DNA genomico comunemente impiegati per monitorare l'infezione da hCMV ($R^2 = 0,998$; coefficiente angolare = -3,266). Si è perciò verificata la capacità del saggio di rilevare e quantificare la presenza dell'mRNA del gene UL21.5 nei virioni di hCMV attraverso un'efficiente reazione di trascrizione inversa e PCR in tempo reale.

Si è inoltre verificata l'assenza di interferenza da parte delle sequenze di DNA genomico corrispondenti all'mRNA del gene UL21.5 presenti nel campione. Nelle diluizioni esaminate, il DNA genomico di hCMV risulta essere concentrato circa 15 volte di più dell'mRNA UL21.5. Tuttavia, nei controlli in cui non è stata utilizzata la trascrittasi inversa e quindi non si è amplificato l'RNA presente nel campione estratto, non è stato rilevato alcun segnale, neppure per i titoli più alti (~3x10⁶ IU di hCMV / mL).

Considerando il titolo in PFU di hCMV/mL del materiale di riferimento nell'analisi dei risultati di questo test, la quantificazione dell'hCMV attraverso l'mRNA del gene UL21.5 contenuto nei virioni è circa 3 volte superiore al valore delle PFU. Questo risultato è conforme all'atteso, in quanto la misurazione delle PFU rileva solo le particelle virali in grado di infettare le cellule e non quelle presenti, ma non infettanti. Inoltre, è possibile che il virione di hCMV trasporti più copie dell'mRNA del gene UL21.5.

Questo esempio mostra che il metodo secondo il trovato ha fornito una quantificazione dell'hCMV contenuto nei campioni simulati molto simile alla concentrazione in PFU di hCMV/mL. La concentrazione in PFU di hCMV/mL è la misura della viremia quando eseguita con il metodo colturale per individuare le particelle virali infettive presenti nel campione del paziente ed è l'indicatore più specifico dell'infezione attiva di hCMV.

Tenendo conto del titolo in copie di DNA genomico di hCMV/mL del materiale di riferimento nell'analisi dei risultati di questo test, la quantificazione dell'hCMV attraverso l'mRNA UL21.5 contenuto nei virioni è 15 volte inferiore a quello delle copie di DNA genomico di hCMV. Questo risultato è conforme all'atteso, in quanto la misurazione delle copie di DNA genomico rileva anche il DNA genomico virale presente nel surnatante di coltura, come accade nei campioni di plasma dei pazienti con infezione attiva da hCMV in trattamento con farmaci antivirali che inibiscono il complesso della terminasi di hCMV

come il letermovir.

Vantaggiosamente, il metodo secondo il trovato fornisce una quantificazione dell'hCMV non influenzata dalla presenza di DNA genomico virale nel surnatante di coltura, DNA che non è contenuto in particelle virali in grado di infettare le cellule. Infatti, nelle diluizioni esaminate la concentrazione delle IU di hCMV è circa 60 volte maggiore di quella delle PFU di hCMV.

Si è in pratica constatato come il metodo secondo il trovato, nonché gli oligonucleotidi ed i kit utili in tale metodo, assolvano pienamente il compito prefissato in quanto consentono di effettuare un rilevamento quantitativo di hCMV in campioni non-cellulari attraverso la trascrizione inversa e la PCR in tempo reale di mRNA virali contenuti nei virioni. Questo metodo può perciò essere applicato con successo ad esempio nel caso di pazienti immunodepressi o immunosoppressi monitorati per la carica virale di hCMV e trattati con antivirali inclusi quelli che causano l'accumulo del DNA virale. L'efficienza del metodo è paragonabile a quella ottenuta con i metodi

basati sul DNA ed è in grado di soddisfare i requisiti delle attuali linee guida per il monitoraggio della carica virale di hCMV nei pazienti trapiantati (Kotton et al., Transplantation 2018; 102(6): 900-931, e Emery V. et al., Br. J. Haematol. 2013;162(1): 25-39). Inoltre il monitoraggio dell'mRNA virale contenuto nelle particelle virali di hCMV nel campione privo della frazione cellulare permette vantaggiosamente di monitorare la presenza di virioni di hCMV circolanti.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per il rilevamento e/o la quantificazione di un mRNA virionico di citomegalovirus umano (hCMV) in un campione prelevato da un paziente trattato con un farmaco antivirale capace di interferire con il taglio e l'incapsidazione del DNA di hCMV, detto metodo comprendente i passaggi di:

- i) opzionalmente rimuovere dal campione prelevato dal paziente ogni componente cellulare eventualmente presente, ottenendo un campione privo di cellule;
- ii) estrarre RNA da un campione privo di cellule prelevato dal paziente o dal campione privo di cellule ottenuto a seguito del passaggio i);
- iii) formare una miscela di reazione mettendo a contatto detto RNA estratto a seguito del passaggio ii) con una soluzione comprendente:
 - d) una o più coppie di primer specifici per detto mRNA virionico di hCMV;
 - e) una DNA polimerasi RNA-dipendente;
 - f) una DNA polimerasi;

iv) sottoporre detta miscela di reazione a un processo di retrotrascrizione in condizioni tali da generare un cDNA corrispondente a detto mRNA virionario di hCMV;

v) sottoporre detto cDNA a un processo di amplificazione in condizioni tali da generare un prodotto di amplificazione costituito da DNA;

vi) rilevare la presenza e/o quantificare la quantità di detto prodotto di amplificazione costituito da DNA, come indicazione della presenza e/o della quantità di mRNA virionario di hCMV nel campione prelevato dal paziente.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1 dove ciascuna di detta una o più coppie di primer è indipendentemente selezionata tra:

una coppia di primer di un primo set ("set 1") in cui un primo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 1-12 e un secondo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 13-45; o

una coppia di primer di un secondo set ("set 2") in cui un primo primer ha una sequenza

selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 50-71 e un secondo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 72-84; o

una coppia di primer di un terzo set ("set 3") in cui un primo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 92-105 e un secondo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 106-111.

3. Metodo secondo la rivendicazione 2 dove:

a) almeno una dell'una o più coppie di primer è una coppia di primer del set 1) e la miscela comprende ulteriormente una sonda avente una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 46-49; o

b) almeno una dell'una o più coppie di primer è una coppia di primer del set 2) e la miscela comprende ulteriormente una sonda avente una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 85-91; o

c) almeno una dell'una o più coppie di primer è una coppia di primer del set 3) e la miscela

comprende ulteriormente una sonda avente una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 112-116.

4. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, dove detto processo di amplificazione è la reazione a catena della polimerasi (PCR).

5. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazione precedenti dove detto farmaco antivirale capace di interferire con il taglio e l'incapsidazione del DNA di hCMV è un inibitore del complesso della terminasi virale.

6. Metodo secondo la rivendicazione 5, dove detto inibitore del complesso della terminasi virale è letermovir o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

7. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, dove detto campione prelevato dal paziente è selezionato dal gruppo costituito da plasma opzionalmente contenente un anticoagulante, siero, urina, saliva, surnatante di un tampone boccale, liquido cefalorachidiano (CSF), lavaggi bronco-alveolari (BAL), lavaggi

naso-faringei, aspirati naso-faringei, surnatante di tamponi faringei, liquido lacrimale, humor vitreo, surnatante di tamponi oculari, surnatante fecale.

8. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, dove detto mRNA virionario di hCMV è un mRNA di un gene o di una regione codificante (ORF o CDS) di hCMV scelto dal gruppo costituito da UL21.5 (SEQ ID NO: 117), UL65 (SEQ ID NO: 122), UL83 (SEQ ID NO: 123), UL106 (SEQ ID NO: 124), UL107 (SEQ ID NO: 125), UL108 (SEQ ID NO: 126), UL109 (SEQ ID NO: 127), UL110 (SEQ ID NO: 128), UL122 (SEQ ID NO: 129), UL123 (SEQ ID NO: 130), TRL/IRL2 (SEQ ID NO: 131), TRL/IRL3 (SEQ ID NO: 132), TRL/IRL4 (SEQ ID NO: 133), TRL/IRL5 (SEQ ID NO: 134), TRL/IRL7 (SEQ ID NO: 135), e TRL/IRL13 (SEQ ID NO: 136).

9. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, dove detto mRNA di hCMV è mRNA del gene UL21.5 (SEQ ID NO: 117).

10. Oligonucleotide costituito da una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS:1-116.

11. Oligonucleotide secondo la rivendicazione 10, dove detto oligonuclotide è un primer avente una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 1-45, SEQ ID NOS: 50-84, e SEQ ID NOS: 92-111.

12. Oligonucleotide secondo la rivendicazione 10, dove detto oligonuclotide è una sonda avente una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 46-49, SEQ ID NOS: 85-91, e SEQ ID NOS: 112-116.

13. Kit per il rilevamento e/o la quantificazione di mRNA virionario di hCMV comprendente:

a) almeno una coppia di primer selezionata tra:

- una coppia di primer di un primo set ("set 1") in cui un primo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 1-12 e un secondo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 13-45; o

- una coppia di primer di un secondo set ("set 2") in cui un primo primer ha una sequenza

selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 50-71 e un secondo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 72-84; o

- una coppia di primer di un terzo set ("set 3") in cui un primo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 92-105 e un secondo primer ha una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 106-111; e

opzionalmente

- b) una DNA polimerasi RNA-dipendente; e
- c) una DNA polimerasi.

14. Kit secondo la rivendicazione 13, dove:

- a) l' almeno una coppia di primer è una coppia di primer del set 1) ed il kit comprende ulteriormente una sonda avente una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 46-49; o

- b) l' almeno una coppia di primer è una coppia di primer del set 2) ed il kit comprende ulteriormente una sonda avente una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS:

85-91; o

c) l' almeno una coppia di primer è una coppia di primer del set 3) ed il kit comprende ulteriormente una sonda avente una sequenza selezionata dal gruppo costituito da SEQ ID NOS: 112-116.