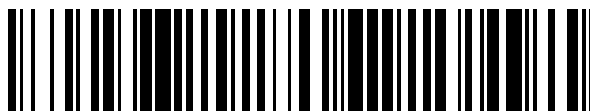


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 410 598**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2006 E 06748221 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 1856295**

54 Título: **Composiciones y métodos para detectar ácidos nucleicos específicos virales en la orina**

30 Prioridad:

**17.02.2005 IT RM20050068
25.05.2005 US 137935**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2013

73 Titular/es:

**TROVAGENE, INC. (100.0%)
11055 Flintkote Avenue
San Diego, CA 92121 , US**

72 Inventor/es:

**MELKONYAN, HOVSEP;
CANNAS, ANGELA;
TOMEI, LOUIS, DAVID y
UMANSKY, SAMUIL, R.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 410 598 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para detectar ácidos nucleicos específicos virales en la orina

5 **Antecedentes de la invención**

Existen en la actualidad tres tipos de sistemas de diagnóstico *in vitro* ampliamente utilizados para la detección de patógenos. Estos son cultivo directo del agente patológico de la muestra biológica; análisis inmunológicos basados en la detección de productos o antígenos del agente infeccioso; y análisis inmunológicos indirectos que pueden detectar los anticuerpos producidos contra el agente infeccioso durante la infección.

En el primer sistema, la principal desventaja es que se debe considerar que la muestra biológica está en riesgo de transmisión del agente patológico. En el segundo y tercer sistemas, las desventajas incluyen la recuperación de la muestra que a menudo es un muestra invasiva y potencialmente infecciosa cuando se recoge. En el tercer sistema, una desventaja importante es que a menudo existe una pequeña posibilidad de discriminar entre infecciones pasadas y actuales.

Más recientemente, se han desarrollado métodos de diagnóstico molecular basados en la detección de los ácidos nucleicos del agente patológico en las muestras de sangre o plasma, o en los cultivos celulares, tomados del paciente. Estos análisis son generalmente mucho más sensibles que los análisis inmunológicos. Sin embargo, pueden requerir la presencia de un equipo especial y personal cualificado. Además, las muestras biológicas - en el caso del plasma, la sangre, o los cultivos de células - son difíciles de almacenar inalterados, excepto bajo condiciones de temperatura controlada, y se considera que suponen un riesgo biológico para el personal que las manipulan.

Recientemente, se han descrito métodos de diagnóstico molecular basados en el ADN transrenal (Tr-ADN) para el seguimiento del progreso de los trasplantes alogénicos, para diagnosticar el sexo de un feto, y para detectar la presencia de marcadores tumorales. (Botezatu et al. *Clinical Chemistry* 46 (8):1078-84 (2000); Su et al. *Ann. NY Acad. Sci.* 1022:81-89 (2004)). Por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.251.638 se describe un método analítico para la detección de ADN fetal masculino en la orina de mujeres embarazadas. En la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.287.820 se describe un sistema destinado al diagnóstico de tumores, en particular de los adenocarcinomas de colon y de páncreas. En la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.492.144 se ilustra que se puede utilizar el método de análisis de ácido nucleico Tr-ADN para realizar un seguimiento del progreso de los trasplantes alogénicos. La presencia de ADN transrenal en la orina, en forma de fragmentos de ácidos nucleicos de menos de 1.000 pares de bases también fue descrita por Al-Yatama et al. (2001), en *Prenat Diagn.* 21:399-402; y Utting, M., et al. (2002), *Clin Cancer Res.* 8:35-40. Keiko Koide, et al, *Prenat Diagn.* 2005; 25: 604-607; Mengjun Wang, et al., *Clinical Chemistry*, 2004, 50: 211-213; Y. H. Su, et al., *J. Mol. Diagn.* 2004, 6:101-107.

La presencia de ADN transrenal ha sido explicada como el resultado del fenómeno de la apoptosis. En el proceso de la apoptosis o muerte celular programada el ADN nuclear se escinde en nucleosomas y oligómeros, que posteriormente, como una parte del proceso de apoptosis, son fagocitados y retirados del organismo. (Umansky, SR, et al. (1982); *Biochim. Biophys. Acta.* 655:9-17). Una parte de este ADN degradado, sin embargo, escapa a la fagocitosis, y aparece en el torrente sanguíneo (Lichtenstein, A.V., et al. (2001), *Ann NY Acad Sci.* 945:239-249), y, como se confirma en las patentes anteriormente mencionadas, también en la orina.

La presencia de ADN viral que se origina a partir de fuentes fuera de las vías urinarias, en la orina no se había descrito con anterioridad a esta solicitud. Se ha demostrado la circulación de ADN viral liberado del genoma de células transfectadas en el plasma. Por ejemplo, se detectaron fragmentos de ADN viral de Epstein-Barr en el plasma de pacientes con carcinoma nasofaríngeo (Chan, K.C., et al. (2002), *Cáncer Res.* 63:2028-2032). Además, el virus de ADN viral del papiloma humano (VPH) se ha detectado en el plasma de pacientes con cáncer de cuello uterino (Pornthanakasem, W., et al. (2001); *BMC Cancer* 1:2). Sin embargo, estos ADN virales no se detectaron en la orina de los pacientes.

La presente invención describe un método para detectar la presencia de patógenos virales en un sujeto a través de la detección de secuencias de ADN de los patógenos en la orina del sujeto.

Compendio de la invención

La presente descripción se refiere a métodos para el diagnóstico y el seguimiento de infecciones virales en un sujeto mediante la detección y cuantificación de secuencias específicas de ácido nucleico viral transrenal en la orina de los sujetos. En una realización, los ácidos nucleicos se aíslan o purifican. Esta purificación puede llevarse a cabo utilizando métodos químicos o físicos. Estos métodos incluyen la extracción con disolventes orgánicos, filtración, precipitación, absorción en matrices sólidas que tienen afinidad por los ácidos nucleicos, y cromatografía. Las matrices sólidas utilizadas en estos métodos se pueden construir a partir de resinas basadas en sílice, resinas de

- intercambio iónico, o hidroxapatita. En otra realización, la matriz sólida es una resina a base de sílice, y dicho aislamiento o purificación se llevan a cabo en presencia de un agente caotrópico. En otra realización, se añaden uno o más agentes a la muestra de orina que inhiben la degradación de los ácidos nucleicos. Estos agentes incluyen agentes quelantes de iones, agentes desnaturizantes y detergentes iónicos. Un ejemplo de un agente quelante de iones utilizado en los métodos de la invención es el EDTA. Los ejemplos de los agentes desnaturizantes utilizados en los métodos de la invención son guanidina-HCl o isotiocianato de guanidina. Los ejemplos de los detergentes no iónicos utilizados en los métodos de la invención son N-laurilsarcosina o dodecilsulfato de sodio. En una realización, los ácidos nucleicos aislados o purificados se utilizan para la detección de ácidos nucleicos virales.
- En otras realizaciones, el método también incluye el fraccionamiento de la muestra de orina, por ejemplo, por medio de centrifugación o filtración, con la separación de una fracción libre de células a partir de una fracción asociada con los cuerpos de las células.
- El análisis de los ácidos nucleicos se lleva a cabo utilizando una de las siguientes técnicas: hibridación de los ácidos nucleicos, reacción con sonda por ciclos, reacción en cadena de la polimerasa, reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR), PCR semi-anidada, polimorfismos de conformación de cadena sencilla, reacción en cadena de la ligasa, amplificación por desplazamiento de hebra, y polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción. En otra realización, la PCR se realiza utilizando uno o más cebadores que son específicos para los genes GAG o POL de VIH-1. Los ejemplos de estos cebadores se describen en la memoria descriptiva como SEQ ID NO: 1-11.
- En otra realización, los ácidos nucleicos virales tienen un tamaño menor de aproximadamente 1000 pb. En una realización preferida, los ácidos nucleicos virales tienen un tamaño entre aproximadamente 100 y aproximadamente 200 pb.
- Los métodos de la invención son aplicables a todos los agentes patogénicos virales, incluyendo virus con ARN, ADN, episómicos, e integradores. También se aplican a los virus recombinantes, tales como los adenovirus o lentivirus utilizados en la terapia génica. En particular, los métodos se aplican a los siguientes virus: retrovirus, incluyendo de VIH-1, VIH-2, virus de la viruela, virus de la poliomielitis, virus del herpes simple (HSV), virus de Epstein-Barr (VEB), el virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis B (VHB) y adenovirus (AAV) recombinantes y naturales. En algunas realizaciones los agentes virales son el virus de Epstein-Barr (VEB) y el VIH-1. En una realización, los métodos de la invención se realizan *in vitro*.
- En otra realización, la invención se refiere a un método para el seguimiento de una infección viral en un sujeto, incluyendo las etapas de cuantificación de la cantidad de un ácido nucleico viral transrenal en una primera muestra de orina de dicho sujeto; cuantificación de la cantidad de dicho ácido nucleico viral transrenal en una segunda muestra de orina de dicho sujeto, y comparación de la cantidad de dicho ácido nucleico viral transrenal en dicha primera y dicha segunda muestra de orina de dicho sujeto, controlando de este modo dicha infección viral en dicho sujeto. En otro aspecto de esta realización, el método comprende adicionalmente la etapa de administrar a dicho sujeto un compuesto que reduce o inhibe dicha infección viral. Opcionalmente, la infección viral es una infección por VIH y dicho compuesto es un agente anti-viral. En otro aspecto de esta realización, la cuantificación se lleva a cabo mediante un método seleccionado entre el emparejamiento con sondas moleculares que son específicas para esos agentes patogénicos, hibridación, PCR, PCR anidada, PCR semi-anidada, SSCP, LCR y SDA. En otro aspecto de esta realización, el método comprende adicionalmente la etapa de separar dichas muestras de orina en una fracción libre de células que contiene dichos ácidos nucleicos transrenales. Esta separación se puede realizar usando centrifugación. Los ácidos nucleicos de esta realización pueden tener entre 100 y 200 pb. En otro aspecto de esta realización, el sujeto está en riesgo de desarrollar una infección viral recurrente.
- En otra de sus realizaciones, la invención se refiere a un kit para la detección de ácido nucleico viral en la orina, como se describe en las reivindicaciones adjuntas, incluyendo: reactivos y/o materiales para el fraccionamiento y/o extracción de los ácidos nucleicos virales transrenales de la orina, sonda de ADN, o pares de oligonucleótidos específicos (cebadores) para al menos un agente viral. En un aspecto de esta realización, la sonda es un cebador para una reacción de PCR que es específica para los genes GAG o POL de VIH-1. Los ejemplos de estos cebadores se describen en la memoria descriptiva como SEQ ID NO: 1-11.
- A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto normal en la técnica a la cual se refiere esta invención. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, los métodos y los materiales adecuados se describen a continuación. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretende que sean limitantes.
- Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una imagen fotográfica que muestra los resultados de la electroforesis en gel del producto de amplificación obtenido por medio de una PCR anidada del ADN transrenal de muestras de orina no fraccionadas de pacientes infectados con VIH-1 (20 ciclos con el par de cebadores 468/602 [134 pb] seguido de 35 ciclos con 518/596 [79 pb]). Los cebadores son específicos para la región GAG de VIH-1.

La Figura 2 es una imagen fotográfica que muestra los resultados de la electroforesis en gel del producto de amplificación obtenido por medio de una PCR anidada del ADN genómico extraído de células LAV 8E5 (20 ciclos con el par de cebadores 468/602 [134 pb] seguido de 35 ciclos con 518/596 [79 pb]). Los cebadores son específicos para la región GAG de VIH-1.

La Figura 3 es una imagen fotográfica que muestra los resultados de electroforesis en gel del producto de amplificación obtenido por medio de una PCR anidada del ADN transrenal de muestras de orina de pacientes infectados con VIH-1 (CP: completa; SN: sobrenadante; PT: sedimento). A-102 pb/60 pb (cebadores específicos para la región POL de VIH-1); B-317 pb/60 pb (específico para POL); C-569 pb/132 pb (específico para TAT); NI: no infectado, IN 1-3: pacientes infectados con VIH.

Descripción detallada de la invención

Las presentes definiciones se ofrecen para los fines de la presente invención:

Amplción: Un término para cualquier fragmento de ADN relativamente pequeño que se replica, p. ej., mediante PCR.

Amplificación: Un aumento en el número de copias de un fragmento de ADN específico puede ocurrir *in vivo* o *in vitro*.

Apoptosis: Muerte celular programada en células humanas y animales que funcionan normalmente cuando la edad o el estado de salud de las células y las condiciones lo dictan. Un proceso activo que requiere la actividad metabólica por parte de la célula moribunda, caracterizado por la escisión del ADN en fragmentos que dan un denominado patrón en escalera de fragmentos de ADN de tamaño nucleosomal y sus oligómeros.

Caotrópico: Propiedad de las sustancias químicas (por ejemplo, iones tales como el SCN, ClO₄⁻, y guanidina) que perturba la estructura termodinámica de agua. Permite que sustancias menos polares y más hidrófobas se vuelvan más solubles en agua. El efecto a nivel biológico es la desnaturalización de las proteínas.

Episoma: Una molécula de ADN circular que puede replicarse independientemente del cromosoma celular o integrarse y replicarse como parte del cromosoma.

Gen: Fragmento de ADN que contiene las secuencias necesarias para codificar para un ARNm, y para controlar la expresión de estas secuencias.

Genoma: Conjunto total de genes de un organismo incluido, en los eucariotas, en las estructuras cromosómicas.

Reacción con sonda por ciclos: Las reacciones CPT se llevan a cabo a una temperatura específica constante, lo que permite la hibridación de la sonda quimérica con su ADN diana monocatenario complementario. Dentro del dúplex diana-sonda resultante, la ARNasa H reconoce el híbrido de ADN-ARN y escinde específicamente la porción de ARN de la sonda. Los fragmentos escindidos no son estables a la temperatura de reacción y se disocian de la diana. A continuación la diana está libre para hibridar con otra molécula sonda y el ciclo se repite. Los fragmentos de la sonda se acumulan, lo que sirve como base para la detección de la diana. Con el tiempo, la acumulación de fragmentos de sonda escindidos sigue una cinética lineal y por lo tanto la cantidad de diana se puede cuantificar.

Hibridación: Una técnica ampliamente utilizada que explota la capacidad de las secuencias complementarias de los ADN o ARN de cadena sencilla para emparejarse entre sí para formar una doble hélice. La hibridación puede tener lugar entre dos secuencias de ADN complementarias, entre un ADN de cadena sencilla y un ARN complementario, o entre dos secuencias de ARN. La técnica se utiliza para detectar y aislar secuencias específicas, medir la homología, o definir otras características de una o ambas cadenas.

Infección: Invasión y multiplicación de microorganismos en tejidos corporales, que pueden ser clínicamente no evidentes o dar como resultado una lesión celular local debida al metabolismo competitivo, toxinas, replicación intracelular o respuesta de anticuerpos a los antígenos.

Reacción en cadena de la ligasa: Un método de amplificación del ADN similar a la PCR. La LCR se diferencia de la PCR, porque amplifica la molécula sonda en lugar de producir un amplicón por medio de la polimerización de nucleótidos. Se utilizan dos sondas por cada cadena de ADN y se ligan entre sí para formar una única sonda. La LCR utiliza tanto una enzima ADN polimerasa como una enzima ADN ligasa para impulsar la reacción. Al igual que la PCR, la LCR requiere un termociclador para impulsar la reacción y cada ciclo da como resultado una duplicación de la molécula de ácido nucleico diana. La LCR puede tener una mayor especificidad que la PCR.

PCR anidada: Una segunda PCR que se realiza sobre el producto de una primera PCR utilizando cebadores, que son internos con respecto a los originales. Esto mejora significativamente la sensibilidad y especificidad de la PCR.

Cebador anidado: Un cebador seleccionado interno con respecto a un amplicón obtenido con un primer ciclo de PCR. El proceso de amplificación que utiliza al menos un cebador anidado mejora la especificidad, ya que los productos no específicos del primer ciclo no se amplifican en el segundo ciclo.

Ácido nucleico: Polímeros lineales de nucleótidos, unidos por uniones fosfodiéster 3', 5'. En el ADN, ácido desoxirribonucleico, el grupo azúcar es desoxirribosa y las bases de los nucleótidos adenina, guanina, timina y citosina. El ARN, ácido ribonucleico, tiene ribosa como azúcar y el uracilo sustituye a la timina. El ADN funciona como un depósito estable de información genética en forma de secuencia de bases. El ARN tiene una función similar en algunos virus, pero más generalmente sirve como un intermedio informativo (ARNm), transportador de aminoácidos (ARNt), para una capacidad estructural o, en algunos casos recién descubiertos, como una enzima.

Oligonucleótido/Polinucleótido: Secuencia lineal de dos o más nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster. Por encima de una longitud de aproximadamente 20 nucleótidos se utiliza generalmente el término "polinucleótido".

Agente patógeno: Un patógeno es un agente biológico que pueda causar una enfermedad a su anfitrión. Un sinónimo del patógeno es "agente infeccioso". El término "patógeno" se utiliza con mayor frecuencia para los agentes que alteran la fisiología normal de un organismo multicelular.

Sedimento: Sedimento, cuando están presentes células, incluye normalmente la fracción celular, o que se puede obtener mediante la centrifugación de una muestra biológica.

Polimerasa: Enzima utilizada en la amplificación de ácidos nucleicos. El término incluye todas las variantes de las ADN polimerasas.

Cebador: Cadena de polinucleótidos pre-existente corta a la cual se pueden añadir nuevos desoxirribonucleótidos por medio de la ADN polimerasa.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa que implica dos cebadores oligonucleotídicos sintéticos, que son complementarios a dos regiones del ADN diana (una para cada cadena) que se van a amplificar, se añaden al ADN diana (que no necesita ser puro), en presencia de exceso de desoxinucleótidos y polimerasa Taq, una ADN polimerasa térmicamente estable. En una serie (típicamente 30) de ciclos de temperatura, el ADN diana se desnaturaliza repetidamente (alrededor de 90°C), se recuece a los cebadores (típicamente a 50-60°C) y una cadena hija se extiende desde los cebadores (72°C). A medida que las propias cadenas hijas actúan como moldes para los ciclos posteriores, los fragmentos de ADN que se emparejen con ambos cebadores se amplifican exponencialmente, en lugar de linealmente.

Sonda: Término general para un fragmento de ADN o ARN que corresponde a un gen o secuencia de interés que se ha marcado radiactivamente, o con alguna otra molécula detectable, tal como biotina, digoxigenina o fluoresceína.

Purificación/descontaminación/esterilización: Se refiere a un procedimiento para la eliminación de contaminantes de una muestra, en donde el resultado es una muestra que contiene 60%, preferiblemente 75%, e incluso más preferiblemente 90% del material al cual se dirige el procedimiento de purificación.

Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP): Un método que permite la relación genética establecida mediante la comparación de los patrones polimórficos característicos que se obtienen cuando se amplifican ciertas regiones de ADN genómico (típicamente mediante PCR) y se cortan con ciertas enzimas de restricción. Las variaciones en tales patrones están generadas por mutaciones que crean o suprimen sitios de reconocimiento para estas enzimas

Muestra: El término se interpretarse en sentido amplio e incluye cualquier forma que contenga ácidos nucleicos (ADN o ARN) en disolución o anclados a un sustrato sólido, donde la definición de "ácidos nucleicos" incluye ADN genómico (por ejemplo, cuando éste está anclado a un sustrato sólido, por ejemplo en la Transferencia Southern o en disolución), ADNc, y otras formas.

Las combinaciones de dos secuencias de ácidos nucleicos mediante hibridación se forman gracias a los enlaces de hidrógeno entre las bases G y C o A y T o análogos de estas bases. Estas combinaciones son complementarias, y las hélices de ADN son anti-paralelas. Esta combinación de hibridación se puede crear con una secuencia (o hélice) en disolución y la otra anclada a una fase sólida (tal como, por ejemplo, en el método FISH [hibridación fluorescente *in situ*]), o bien con ambas de secuencias en disolución.

Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP): El SSCP es la separación electroforética de ácidos nucleicos de cadena sencilla basada en diferencias sutiles en la secuencia (a menudo un solo par de bases) que da como resultado una estructura secundaria diferente y una diferencia medible en la movilidad a través de un gel.

Amplificación por Desplazamiento de Cadena (STA): La STA es una técnica de amplificación de ácido nucleico isotérmica, *in vitro* basada en la capacidad de HincII para mellar la cadena no modificada de una forma hemifosforotioato de su sitio de reconocimiento, y la capacidad del fragmento de Klenow carente de exonucleasa de la ADN Polimerasa (exo-Klenow) para prolongar el extremo 3' en la mella y desplazar la cadena de ADN aguas abajo. La amplificación exponencial resulta del acoplamiento de las reacciones efectora y antisentido donde las cadenas desplazadas de una reacción efectora sirven como diana para una reacción antisentido y viceversa.

Secuencia diana: Secuencia de ADN que debe ser analizada por medio de hibridación, amplificación, u otros métodos o combinaciones de métodos.

T_m (temperatura de fusión): Temperatura a la cual una población de ADN de doble hélice específica disocia en polímeros de una sola cadena. La fórmula para calcular esta temperatura para los fragmentos de polinucleótidos es bien conocida en la técnica: $T_m = 81,5 + 0,41 (\% G + C)$ (Anderson y Young, "Quantitative filter

hybridization", in nucleic acid hybridization [1985]). Para los oligonucleótidos de menos de 40 pares de bases, se puede utilizar una fórmula simplificada: $T_m = 3^\circ\text{C} \times (G + C) + 2 \times (A + T)$.

ADN/ARN Tr: ADN/ARN transrenal, o ADN/ARN presente en la orina después de haber pasado a través de la barrera renal.

5 Tracto urinario: Incluye los órganos y conductos que participan en la eliminación de la orina del organismo.

Ácidos nucleicos de la orina en las infecciones por patógenos virales

10 La presente invención se basa en el descubrimiento de que después de una infección viral, los ácidos nucleicos del virus o los virus o de origen viral se escinden en fragmentos relativamente cortos que se encuentran en la orina. Muchos de estos ácidos nucleicos específicos de patógenos atraviesan la barrera transrenal (estos ácidos nucleicos se denominan generalmente tARN, o TrADN o TrARN) y se pueden detectar en la orina en forma de fragmentos de bajo peso molecular libres de células (cuya longitud es de menos de 1000 nucleótidos, pero tienen preferiblemente menos de 500 pb de longitud, y más preferiblemente son más cortos que 250-300 pb de longitud o más cortos que 15 250 pb de longitud) por medio de métodos moleculares. Estos ácidos nucleicos transrenales derivan de virus que se encuentran fuera del tracto urinario de un sujeto. Según se utiliza en la presente memoria, el término "ácido nucleico viral" abarca ácidos nucleicos de origen viral. Otros ácidos nucleicos específicos de virus pueden ser desprendidos por virus o células que están dentro del riñón, y por lo tanto no tienen que cruzar la barrera transrenal con el fin de ser detectados en la orina. Adicionalmente, algunos ácidos nucleicos específicos de virus se pueden encontrar en la 20 orina a través de otros mecanismos, además de cruzar la barrera transrenal o de ser generados por virus en el riñón.

25 La presencia de ácidos nucleicos transrenales (Tr-AN) en la orina se detectó previamente sólo en anfitriones que habían sido sometidos a trasplantes de tejidos u órganos heterólogos, en el caso de mujeres embarazadas con fetos masculinos, y en el caso de tumores caracterizados por genes marcadores específicos. La presencia de ácidos nucleicos transrenales de origen viral en el caso de las infecciones virales de acuerdo con la presente invención también se detecta, y preferiblemente se detecta, en el caso de infecciones del tracto no urinario, incluso en ausencia de hematuria o de patologías que conducen a la ruptura, o que alteran la integridad normal, de la barrera renal.

30 Los ácidos nucleicos transrenales (Tr-AN) de origen viral no están asociadas, y derivan de, el genoma de virus que se pierden o se liberan en el tracto urinario y que se encuentran en la orina. En lugar de eso, los ácidos nucleicos transrenales son filtrados mediante un mecanismo de filtración glomerular-renal. De este modo, las dimensiones de los fragmentos de ácidos nucleicos transrenales son generalmente menores que aproximadamente 1.000 pares de bases, p. ej., menores que aproximadamente 500, menores que aproximadamente 300, menores que alrededor de 35 250, o entre aproximadamente 100 y aproximadamente 200 pares de bases, en oposición a otras situaciones en las que el ADN tiene por lo general un peso molecular elevado y una longitud que excede de 1000 bases o pares de bases.

40 Por lo tanto, en la presente invención, el ácido nucleico transrenal (Tr-AR) de origen viral generalmente no se encuentra en el sedimento de la orina, sino en la fracción soluble, a pesar de que algunas trazas Tr-AN pueden sedimentar simultáneamente con las células durante la centrifugación.

45 El descubrimiento confirma la presencia de ácidos nucleicos urinarios o ácidos nucleicos transrenales derivados de virus patogénicos en la orina, y por lo tanto es aplicable al diagnóstico de todas las enfermedades infecciosas causadas por patógenos virales.

50 Por lo tanto, en las realizaciones, la invención hace referencia a métodos para el diagnóstico o el seguimiento de una infección viral mediante la determinación de la presencia de ácidos nucleicos virales, preferiblemente ADN viral o ARN de origen viral, en una muestra de orina. Los métodos incluyen la etapa de determinación de la presencia de ácidos nucleicos virales transrenales utilizando métodos generalmente empleados en la práctica de laboratorio, tales como la hibridación, PCR, PCR anidada, PCR semi-anidada, SSCP, LCR y SDA.

55 En ciertas realizaciones, los métodos de acuerdo con la invención incluyen un tratamiento inicial de la muestra de orina antes de la determinación de la presencia de ácidos nucleicos virales transrenales. En una realización, la invención incluye el tratamiento previo de la muestra de orina con un agente que inhibe la degradación del ADN o el ARN. Estos agentes incluyen los inhibidores enzimáticos, tales como agentes quelantes, detergentes, o agentes desnaturizantes, inhibidores de ADNasa o ARNasa, que se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en EDTA, guanidina-HCl, isotiocianato de guanidina, N-laurilsarcosina, y dodecilsulfato de sodio.

60 En otra realización, la determinación de la presencia de ácidos nucleicos virales transrenales está precedida opcionalmente de centrifugación o filtración de la muestra de orina con el fin de separar la fracción celular de la orina de los ácidos nucleicos de bajo peso molecular libres de células (ADN/ARN). Sin embargo, la muestra de orina también se puede utilizar sin fraccionamiento. La centrifugación se lleva a cabo preferiblemente a una velocidad

entre 2500 g y 4500 g, y más preferiblemente entre 3000 g y 4000 g. Se prefiere llevar a cabo la filtración a través de un filtro con un tamaño de poro entre 0,1 y 5,0 μm , más preferiblemente con un tamaño de poro entre 0,2 y 1,0 μm y aún más preferiblemente de 0,45 y 0,8 μm . También se pueden utilizar métodos equivalentes para la separación de la fracción soluble de la fracción celular.

5 El aislamiento o la purificación opcionales y la cuantificación de los ácidos nucleicos transrenales se logran mediante el uso de métodos químicos o físicos que ya son conocidos en la técnica. Se incluye al menos una etapa de purificación, utilizando métodos seleccionados entre extracción con disolventes orgánicos, filtración, precipitación, absorción sobre matrices sólidas (p. ej., a través de intercambio iónico), cromatografía de afinidad o bien
10 cromatografía de exclusión molecular o combinaciones de estos métodos.

Sin embargo, el método de purificación debe ser apropiado para el aislamiento de ADN (de cadena sencilla o doble) que tenga menos de 1000 nucleótidos de longitud, con un peso molecular correspondiente, suponiendo, como peso molecular medio, el de un nucleótido que tiene un valor de 330 Daltons. En algunas realizaciones, la purificación es
15 específica para los fragmentos que son más pequeños que 500 nucleótidos (nt) de longitud, con un peso molecular correspondiente, tales como fragmentos cuyas longitudes son menores de 300 nt, fragmentos menores de 250 nt de longitud, o fragmentos cuyas longitudes están entre 100 y 200 pares de bases de ácidos nucleicos (nt).

El aislamiento y/o purificación de los ácidos nucleicos transrenales se logra mediante el uso de métodos químicos o físicos que ya son conocidos en la técnica. Éstos incluyen una o más etapas de purificación utilizando métodos seleccionados entre extracción con disolventes orgánicos, filtración, precipitación, absorción sobre matrices sólidas (p. ej., resina de sílice, hidroxapatita o de intercambio iónico), cromatografía de afinidad (p. ej., por medio de captura específica de secuencias ligandos específicos de ácidos nucleicos), o bien cromatografía de exclusión molecular.
20 Sin embargo, el método de purificación debe ser apropiado para el aislamiento de ADN (hebra sencilla o doble) cuyas dimensiones son menores de 1.000 pares de nucleótidos. Incluso más preferiblemente, la purificación es específica para fragmentos que son menores de 500 nucleótidos, e incluso más preferiblemente, fragmentos cuyas longitudes son menores de 300 o 250 pares de bases, o que están entre 100 y 200 bases o pares de bases. La purificación tiene lugar preferiblemente sobre una matriz que consiste en, pero no se limita a, una resina de sílice.

En una realización preferida, el método de aislamiento de ADN se implementa mediante tratamiento previo de la muestra de orina con un agente desnaturalizante, tal como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, urea, guanidina HCl, o isotiocianato de guanidina, a temperatura ambiente. Preferiblemente se utiliza isotiocianato de guanidina. La muestra se hace pasar después a través de una fase sólida, preferiblemente una matriz que consiste en una resina de sílice que, en presencia de sales caotrópicas (isotiocianato de guanidina), se une a los ácidos
30 nucleicos. A continuación la muestra se recoge o se hace eluir en un tampón, tal como Tris-EDTA (Tris 10 mM, EDTA 1 mM), o en agua.

En otra realización preferida, la caracterización y la determinación de la presencia de AN viral transrenal se realizan por medio de una técnica seleccionada del grupo que consiste en: hibridación de los ácidos nucleicos, una reacción con sonda por ciclos (F. Bekkaoui et al., en *Biotechniques* 20:240-248 [1996]), una reacción en cadena de la polimerasa (PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, de M. Innis et al.; Elsevier Publications, 1990), una reacción en cadena de la polimerasa anidada, polimorfismo de conformación de cadena sencilla, una reacción en cadena de la ligasa (LCR) (F. Barany, en *PNAS USA*, 88:189-93 [1991]), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) (G.K. Terrance Walker, et al., en *Nucleic Acid Res.*, 22:2670-77 [1994]), y polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Un experto en la técnica también podría utilizar combinaciones de estos métodos, p. ej., PCR-Polimorfismo de Longitud de Restricción, donde los ácidos nucleicos se amplifican, y después se dividen en alícuotas y se digieren con enzimas de restricción, y luego se separan a través de electroforesis.
40

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es el método preferido para la detección y/o análisis cuantitativo de los ácidos nucleicos. Aún más preferido es el método de PCR anidada, como se ha definido anteriormente, o el método de PCR semi-anidada, en el que solo uno de los dos cebadores es interno con respecto al amplicón.
50

La ventaja del método está ligada principalmente a la facilidad de recogida de las muestras biológicas; al hecho de que los ácidos nucleicos transrenales no son infecciosos; y a la sensibilidad del método de diagnóstico molecular que se puede aplicar a los ácidos nucleicos, incluso en forma de fragmentos.
55

El método de diagnóstico es aplicable a todos los agentes patogénicos virales, incluyendo virus con ARN, ADN, episómicos, o integrados. También se aplica a los virus recombinantes, tales como los adenovirus o lentivirus utilizados en la terapia génica. En particular, el método se aplica preferiblemente a los siguientes virus: VIH-1, VIH-2, virus de la viruela, virus de la polio, virus del herpes simple (VHS), virus de Epstein-Barr (VEB), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis B (VHB) y adenovirus (AAV) recombinante y naturales.
60

El método se aplica preferiblemente al virus VIH-1, con la selección de sondas u oligonucleótidos cebadores de la región GAG, POL, o TAT para la detección. Los pares de cebadores particularmente preferidos son los que

consisten en secuencias específicas para la región GAG de VIH, y preferiblemente los correspondientes a la secuencia IDN 1-4, y los que son específicos para la región POL del VIH-1, preferiblemente los correspondientes a la región IDN5-7, cuando la detección se lleva a cabo por medio de una reacción en cadena de polimerasa (PCR), y, en particular, a través de PCR anidada (GAG) o semi-anidada (POL).

5 La invención hace referencia a un kit para la detección y el seguimiento de AN viral transrenal en la orina, como se describe en las reivindicaciones adjuntas, incluyendo: reactivos y/o materiales para la separación y/o purificación de ADN transrenal a partir de una muestra de orina, sondas de ADN, o pares de oligonucleótidos específicos (cebadores) para al menos un agente viral. Los tubos de reacción, los agentes para el tratamiento previo de la muestra, las enzimas para marcar la sonda, y enzimas para la amplificación del ADN pueden estar presentes opcionalmente.

15 En una realización preferida, el kit incluye pares de cebadores oligonucleotídicos que son específicos para VIH-1, VIH-2, virus de la viruela, virus de la polio, virus del herpes simple (VHS), virus de Epstein-Barr (VEB), el virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis B (VHB), adenovirus (AAV) recombinantes y naturales; o, aún más preferiblemente, cebadores que se seleccionan del grupo que consiste de las secuencias que se enumeran a continuación, y reactivos específicos para la reacción en cadena de la polimerasa, preferiblemente en forma anidada o semi-anidada.

20 Métodos para la amplificación y detección de ácidos nucleicos de la orina

El término ácido nucleico hace referencia a un oligonucleótido, nucleótido, polinucleótido, o fragmentos/partes de los mismos y a ADN o ARN de origen natural (p. ej., genómico) o sintético. Puede ser de hélice doble o sencilla, y también puede representar la dirección efectora o antisentido de una secuencia. Hélice paralela (5' → 3'); hélice antiparalela (3' → 5'). Los términos oligonucleótido, polinucleótido y polímero de ácido nucleico son equivalentes, y se entiende que hacen referencia a una molécula que consiste en más de dos bases de ácido desoxirribonucleico o ribonucleico. El número de nucleótidos (bases) y la longitud del fragmento oligonucleotídico pueden variar. Se pueden sintetizar de diferentes maneras. Tradicionalmente las secuencias se definen con un inicio en 5' y una terminación en 3'. Estos números indican la dirección de la secuencia.

30 El ADN aislado de la orina de un sujeto se puede amplificar a continuación con el fin de ser detectado. Los métodos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR anidada, PCR semi-anidada, análisis de Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP), reacción en cadena de la ligasa (LCR) y amplificación por desplazamiento de cadena (SDA). La detección de los ADN transrenales también se lleva a cabo por medio de hibridación de al menos un cebador marcado.

40 La hibridación es un método que permite que dos secuencias de ácido nucleico se reconozcan entre sí como complementarias y que se ensamblen entre sí (recocido). La complementariedad/complementarias secuencias son secuencias de polinucleótidos que interactúan entre sí, dependiendo de la interacción entre las bases. Por ejemplo, la secuencia AGTC es complementaria a TCAG de acuerdo con el patrón de emparejamiento de bases de Watson y Crick. Sin embargo, otras combinaciones tales como el emparejamiento de bases de Hoogsteen son bien conocidas por los expertos normales en la técnica. Es posible tener una secuencia total o parcialmente complementaria, y esto es lo que determina la eficacia o la fuerza de atracción entre las dos secuencias. La complementariedad media evitaría que hibridara una complementariedad fuerte, en condiciones que permitieran que permanecieran unidas.

45 La capacidad de hibridación de las secuencias de ácido nucleico es un fenómeno bien conocido. El primer método de hibridación fue descrito por Marmur y Lane, PNAS USA, 46:453 (1960) y 461 (1960), pero desde entonces se ha perfeccionado como técnica en la biología molecular. Hoy en día, el término "hibridación" incluye, entre otros, la hibridación en ranura/puntiforme. Las condiciones que permiten que las secuencias de nucleótidos se reconozcan entre sí (hibridación) se pueden modificar de tal manera que se produzca una hibridación completa (complementariedad con alta especificidad) o una hibridación parcial (complementariedad con especificidad media). En la presente solicitud, siempre que se utilice el término "hibridación", se debe entender que las condiciones hacen referencia a las que permiten una complementariedad media o alta. El experto en la técnica puede calcular cuántas secuencias artificiales se necesitan para fomentar la hibridación entre dos secuencias complementarias en la dirección opuesta, conocida como asociación antiparalela.

60 Una sonda es un oligonucleótido que se puede producir artificialmente o naturalmente, y que forma una combinación con otra secuencia de ácido nucleico. Las sondas son útiles para descubrir secuencias específicas en una muestra que contiene ADN desconocido. En esta patente, todas las sondas se pueden unir a una molécula de señalización (o informadora). La molécula informadora hace que sea posible la detección de la sonda (por ejemplo, por medio de reacciones enzimáticas (p. ej., ELISA (Análisis de Inmunoabsorción ligada a enzima)), radiactividad, fluorescencia, u otros sistemas).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método de amplificación de una secuencia de ADN que utiliza cebadores complementarios y una polimerasa sensible al calor. Una clase de enzimas utilizadas en la amplificación de ácidos nucleicos específicos son las ADN polimerasas referidas como polimerasas Taq (*Thermus aquaticus*). Los cebadores son oligonucleótidos a partir de los cuales, en condiciones apropiadas, se puede iniciar la síntesis de polinucleótidos. Un cebador puede existir de forma natural (por ejemplo, en una digestión enzimática de un polinucleótido), o se puede obtener por medio de síntesis química. El producto amplificado en la PCR es referido a menudo como amplicón.

La PCR anidada es una segunda PCR que se realiza sobre el producto de una PCR anterior utilizando un segundo conjunto de cebadores que son internos con respecto al primer conjunto de cebadores, referidos como cebadores anidados. Esto mejora significativamente la sensibilidad y especificidad de la PCR. Los cebadores anidados son cebadores internos con respecto a un amplicón obtenido con un primer ciclo de PCR. El proceso de amplificación que utiliza al menos un cebador anidado mejora la especificidad, ya que los productos no específicos del primer ciclo no se amplifican en el segundo ciclo, debido a que carecen de la secuencia que corresponde al cebador anidado. La PCR semi-anidada es una segunda PCR, que utiliza un nuevo cebador y uno de los cebadores originales. Este proceso también mejora la especificidad.

La Reacción en Cadena de la Ligasa (LCR) es un método de amplificación del ADN similar a la PCR. La LCR se diferencia de la PCR en que amplifica la molécula sonda en lugar de producir un amplicón través de la polimerización de nucleótidos. Se utilizan dos sondas por cada cadena de ADN y se ligan entre sí para formar una única sonda. La LCR usa tanto una enzima ADN polimerasa como una enzima ADN ligasa para impulsar la reacción. Al igual que la PCR, la LCR requiere un termociclador para impulsar la reacción y cada ciclo da como resultado una duplicación de la molécula de ácido nucleico diana. La LCR puede tener una especificidad mayor que la PCR.

En el análisis de Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla (SSCP) un pequeño producto de PCR (amplicón) se desnaturaliza y se somete a electroforesis por medio de un gel de poliacrilamida no desnaturizante. De este modo, a medida que el producto de la PCR se mueve en y a través del gel (y lejos del desnaturizante), recuperará la estructura secundaria que es dependiente de la secuencia (similar a la estructura secundaria del ARN). La movilidad de los productos de la PCR de cadena sencilla dependerá de su estructura secundaria. Por lo tanto, los productos de PCR que contienen diferencias de sustitución en la secuencia, así como inserciones y deleciones tendrán diferentes movilidades.

La amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) es un método de amplificación de ácido nucleico isotérmico basado en la actividad de corte dirigida por cebadores de una enzima de restricción y la actividad de desplazamiento de cadena de una polimerasa carente de exonucleasa.

Los términos purificación o aislamiento hacen referencia a un procedimiento para la eliminación de contaminantes de una muestra, donde el resultado es una muestra que contiene 50%, 60%, 75%, 90% o más de 90% del material al cual está dirigido el procedimiento de purificación.

Para las condiciones de temperatura restrictivas en el caso de la hibridación de ácidos nucleicos, estos términos hacen referencia normalmente a una temperatura variable entre un máximo, para un ácido nucleico, representado por T_m menor de 5°C, y un mínimo representado por T_m menor de 25°C. La técnica utilizada en el campo emplea condiciones de temperatura restrictivas, combinadas con otros parámetros (p. ej., concentración salina), para distinguir secuencias con una homología casi exacta.

Las condiciones restrictivas son conocidas por los expertos en la técnica y se pueden encontrar en Ausubel, et al., (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Preferiblemente, las condiciones son tales que las secuencias homólogas al menos aproximadamente 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% entre sí permanecen típicamente hibridadas entre sí. Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación restrictivas es la hibridación en un tampón de alta concentración de sal que comprende 6X SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,02%, y 500 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 65°C, seguido de uno o más lavados en 0,2 X SSC, BSA al 0,01% a 50°C.

En una segunda realización, se proporciona una secuencia de ácido nucleico que es hibridable con la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos, o fragmentos, análogos o derivados de la misma, en condiciones de restricción moderada. Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación de restricción moderada es la hibridación en 6X SSC, 5X solución de Reinhardt, SDS al 0,5% y 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 55°C, seguido de uno o más lavados en 1X SSC, SDS al 0,1% a 37°C. Otras condiciones de restricción moderada que pueden utilizarse son bien conocida en la técnica. Véase, p. ej., Ausubel, et al. (Eds.), 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y., y Krieger, 1990; *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, N.Y.

En una tercera realización, se proporciona un ácido nucleico que es hibridable con la molécula de ácido nucleico, o fragmentos, análogos o derivados de la misma, en condiciones poco restrictivas. Un ejemplo no limitante de las condiciones de hibridación poco restrictivas es la hibridación en formamida al 35%, 5X SSC, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM, PVP al 0,02%, Ficoll al 0,02%, BSA al 0,2%, 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, sulfato de dextrano al 10% (p/v) a 40°C, seguido de uno o más lavados en 2X SSC, Tris-HCl 25 mM (pH 7,4), EDTA 5 mM, y SDS al 0,1% a 50°C. Otras condiciones poco restrictivas que se pueden utilizar son bien conocidas en la técnica (p. ej., como las empleadas para las hibridaciones cruzadas entre especies). Véase, p. ej., Ausubel, et al. (Eds.), 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, y Kriegler de 1990, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, N.Y; Shilo y Weinberg, 1981. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 6789-6792.

La invención también proporciona un kit para la detección y/o determinación del genotipo de un ácido nucleico viral en una muestra de orina de un sujeto que lo necesite, que comprende al menos un cebador directo seleccionado entre los SEQ ID NO: 1, 3, 5, 9 y 11 y al menos un cebador inverso seleccionado entre los SEC ID NO: 2, 4, 6, 7, 8 y 10, ya sea en el mismo envase o en envases separados, y las instrucciones para su uso. En una realización, este ácido nucleico viral deriva de VIH.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

EJEMPLOS

El experto en la técnica puede modificar la totalidad de la metodología descrita en la presente memoria sin ningún cambio en la idea principal básica.

Ejemplo 1. Estabilización y preparación de las muestras.

Todas las etapas de preparación de las muestras de orina y de los análisis del ADN transrenal se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Brevemente, se recogieron aproximadamente 50-60 ml de muestras de orina de cada paciente que participaba en el estudio. En el plazo de 30 minutos después de la recogida, se añadió una disolución que consistía en EDTA 0,5 M y Tris-HCl 0,5 M, a un pH que oscilaba de 8,0 a 8,5, a una concentración final 10 mM con el fin de inhibir las nucleasas que pudieran estar presentes en las muestras de orina. Se identificaron al menos tres enzimas nucleolíticas en la orina, ADNasa I, ADNasa II y fosfodiesterasa. El EDTA inhibe la actividad de la ADNasa I y la fosfodiesterasa por medio de quelación de metales divalentes tales como Mg^{2+} , Ca^{2+} y/u otros que son necesarios para su actividad. La ADNasa II es máximamente activa en un entorno ácido. La complementación de la orina con tampón Tris-HCl pH 8,0 aumenta el pH de la orina inhibiendo de este modo la actividad de la ADNasa II.

Se pueden tomar cantidades mayores de orina por sujeto, p. ej., 100-1000 ml. Estas muestras más grandes se pueden concentrar y utilizar para crear concentraciones más altas de ácidos nucleicos virales muy diluidos encontrados en la orina.

Las muestras de orina estabilizadas se pueden almacenar, en alícuotas de 5 ml, a -80°C. Opcionalmente, se congelan 25 ml de solución salina para que actúe como un control.

Otros métodos para la preparación de muestras de orina y para la extracción del ADN se describen en la Patente PCT Núm. WO 98/54364.

Ejemplo 2. Fraccionamiento de orina

Para las aplicaciones basadas en Tr-ADN, que implican el análisis cuantitativo de Tr-ADN, a menudo se requiere el fraccionamiento de la orina. Éste reduce el impacto de las nucleoproteínas de las células presentes en la orina sobre la cuantificación exacta de complejo Tr-ADN/proteína, Tr-ADN total, o marcadores genéticos específicos. En los experimentos de los autores de la presente invención éstos han empleado dos procedimientos para el fraccionamiento de la orina, centrifugación y filtración. Ambos se llevaron a cabo inmediatamente después de la recogida de la orina y, antes de complementar el espécimen con la mezcla estabilizadora de Tris-EDTA. La orina se puede mantener en este estado, siempre y cuando las células de la orina estén intactas y sus componentes no se derramen en la orina y contaminen Tr-ADN con ADN celular.

Para la filtración se puede utilizar filtros con tamaño de poro que oscila entre 0,1 y 5 μm con capacidad de unión reducida a ácido nucleico y proteínas. La elección del filtro depende de la diana bajo análisis. En los experimentos de los autores de la presente invención estos utilizaron Unidades de Filtro de 0,45 μm Luer-lock (Núm. de Cat. SLHV033RS) o Unidades de filtro de 150 ml de 0,45 μm STERICAP (Núm. de Cat. SCHVU01RE) ambos de Millipore. Después de la filtración las muestras se complementaron con una disolución de conservación de EDTA-Tris y se llevaron a los procesos posteriores de extracción de ADN o se dividieron en alícuotas y se almacenaron

congeladas a -80°C. La fracción celular de orina se puede recoger extrayéndolo del filtro mediante la aplicación de una disolución (altas concentraciones de sales o agentes caotrópicos) que se sabe que disuelven las células.

El fraccionamiento de la orina mediante centrifugación en los experimentos de los autores de la presente invención se llevó a cabo inmediatamente después de la recogida de la muestra, antes de la adición de la mezcla de conservación. La centrifugación se realizó a temperatura ambiente a RCF que oscilaba entre 3.500 y 4000xg durante aproximadamente 15 min. El sobrenadante se recogió cuidadosamente y se manipuló mediante el procedimiento descrito anteriormente para la filtración de la orina. El sedimento que consistía principalmente de las células y restos celulares se resuspendió en solución fisiológica y se almacenó a -80°C.

Ejemplo 3. Extracción y purificación de los ácidos nucleicos de la orina.

En el experimento de los autores de la presente invención estos utilizaron el protocolo de extracción de ADN basado en sílice en dos formatos diferentes. Uno se llevó a cabo a vacío y el segundo, con centrifugación.

Procedimiento basado en vacío

A la muestra de orina se le añadió Tiocianato de Guanidina 6 M (GITC) (Amresco, Núm. de cat. 0380) a una concentración final no inferior a 3 M. Esta disolución se mezcló vigorosamente y se complementó con 0,25 ml de suspensión de sílice Wizard (Promega, Núm. de Cat. A7141) por 10 ml de volumen de orina inicial. Para capturar el ADN la mezcla se hizo girar continuamente durante 1 hora a temperatura ambiente. La resina con el ADN capturado se recogió cargando la mezcla en un montaje de una jeringa con minicolumna (Promega, Núm. de Cat. A7211) conectado a una línea de vacío. La resina se recogió mediante la aplicación de vacío, se lavó dos veces con 5 ml de disolución de GITC 3M. La resina se lavó adicionalmente dos veces mediante una disolución que consistía en etanol del 80% y NaCl 50 mM. A continuación, la minicolumna se separó y la resina se lavó adicionalmente dos veces con etanol del 96% mediante centrifugación en una microcentrífuga de sobremesa en tubos de 1,5 ml. El ADN se hizo eluir mediante una breve centrifugación con agua caliente en un volumen de no más de 1/20 el volumen inicial de orina.

Procedimiento basado en la centrifugación

A la muestra de orina se le añadió Tiocianato de Guanidina 6 M (GITC) (Amresco, Núm. de cat.0380) a una concentración final no inferior a 3 M. Esta disolución se mezcló vigorosamente y se complementó con 0,25 ml de suspensión de sílice Wizard (Promega, Núm. de Cat. A7141) por 10 ml de volumen de orina inicial. Para capturar el ADN, la mezcla se hizo girar continuamente durante 1 hora a temperatura ambiente. La resina con el ADN capturado se recogió mediante centrifugación a aproximadamente 4000xg durante aproximadamente 5 min a temperatura ambiente. La resina sedimentada se lavó una vez con disolución de GITC y una vez con tampón de lavado, a continuación, se transfirió a una mini-columna y se lavó una vez más con etanol del 96%. El ADN se hizo eluir con agua caliente en un tubo de microcentrífuga mediante una breve centrifugación. El ADN se hizo eluir mediante una breve centrifugación con agua caliente en un volumen de no más de 1/20 el volumen inicial de orina.

Ejemplo 4. Diseño de cebadores de PCR

Los cebadores para el análisis de Tr-ADN basado en el uso de la PCR se seleccionaron para dos tamaños diferentes del fragmento diana, es decir, uno en el intervalo de 60 a 120 pb y el otro en el intervalo de 250 a 400 pb. Todos los cebadores se compararon también con la secuencia completa del genoma humano. Los cebadores se diseñaron utilizando el paquete de programas FastPCR (biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1_html/oligos). Los cebadores para el análisis de PCR anidada se seleccionaron utilizando el paquete Primer 3, que está disponible en el sitio frodo.wi.mit.edu/cg-i-bin/primer3/primer3_www.cgi, de tal manera que la temperatura de fusión de los cebadores anidados, internos no fuera más baja que la de los cebadores externos.

Los cebadores de VIH se seleccionaron para el reconocimiento de los 9 subtipos de VIH de tipo M. De acuerdo con la nomenclatura revisada recientemente (esto es, the 1999 Nomenclature Proposal: [hiv.lanl.gov/content/hiv-db/HTML/reviews/nomenclature/Nomen]), subtipos del grupo M de VIH-1 se representan por grupos asociados filogenéticamente de secuencias de VIH-1. Estos se denominan A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J y K. El grupo M contiene virus, que representan aproximadamente 95% de todos los casos de VIH en Europa. Las secuencias genómicas completas de los subtipos del grupo M de VIH-1 se obtuvieron de la base de datos de Los Alamos National Laboratory (Nuevo México, hiv.lanl.gov). Los alineamiento múltiples y la creación de secuencias consenso de los diferentes subtipos se llevaron a cabo mediante el uso del algoritmo ClustalX incluido en el paquete BioEdit (mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html).

Se seleccionaron los siguientes cebadores:

Cebadores GAG para PCR anidada.

Externo:

GAG 468-F (SEQ ID NO: 1): TGGGTAAGTAATAGAGGAGAAGGC;

GAG 602-R (SEQ ID NO: 2): AACATTTGCATGGCTGCTT.

Producto: 134 pb.

Interno:

GAG 518-F (SEQ ID NO: 3): CAGCATTATCAGAAGGAGCCACC;

5 GAG 596-R (SEQ ID NO: 4): TGCATGGCTGCTTGATGTCC.

Producto: 79 pb.

Cebadores POL para PCR semi-anidada, amplicón corto

Cebadores externos:

POL 4368-F (SEQ ID NO: 5): GGRGAAGCCWTGCATGGAC;

10 POL 4468-R (SEQ ID NO: 6): GCTACATGRACTGCTACCAG.

Producto: 102 pb.

Cebadores internos:

POL 4368-F (SEQ ID NO: 5): GGRGAAGCCWTGCATGGAC;

POL 4427-Rn (SEQ ID NO: 7): TGTRCAATCTARTTGCCATATYCCTGG.

15 Producto: 60 pares de bases.

Cebadores POL para PCR semi-anidada, amplicón largo

Cebadores externos:

POL 4368-F (SEQ ID NO: 5): GGRGAAGCCWTGCATGGAC

POL 4678-R (SEQ ID NO: 8): ACTCCYTGRCTTTGGGGATTG

20 Producto: 311 pb.

Cebadores internos (anidados):

POL 4368-F (SEQ ID NO: 5): GGRGAAGCCWTGCATGGAC

POL 4427-Rn (SEQ ID NO: 7): TGTRCAATCTARTTGCCATATYCCTGG.

Producto: 60 pares de bases.

25 Cebadores TAT para PCR semi-anidada (amplicón largo)

Cebadores externos:

TAT 5955-F (SEQ ID NO: 9): GCTTAGGCATYTCCTATGGCAG

TAT 6462-R (SEQ ID NO: 10): TGGGGTCTGTKGGTACACAGG.

Producto: 569 pb.

30 Cebadores internos:

TAT 6330-Fn (SEQ ID NO: 11): CWGHTHTAYTATGGRGTACCTGTGTGG

TAT 6462-R (SEQ ID NO: 10): TGGGGTCTGTKGGTACACAGG.

Producto: 132 pb.

35 Ejemplo 5. Diagnóstico de la infección por VIH-1 basado en TrADN.

El ADN se aisló de las muestras de orina de 10 pacientes infectados con el VIH, como se describe en los ejemplos precedentes. Se diagnosticó clínicamente que estos pacientes habían sido infectados con el VIH por medio del uso de ensayos moleculares clínicos convencionales para detectar la presencia de anticuerpos que son específicos para el virus del VIH.

La Figura 1 muestra la electroforesis de los fragmentos de ADN del VIH, amplificados mediante PCR anidada, con los dos pares de cebadores específicos de GAG indicados anteriormente, de acuerdo con el método descrito en la invención. Se observó una banda cuyas dimensiones correspondían a las que se esperaba como resultado de la amplificación mediante PCR anidada - realizada con el uso del par de cebadores 468/602 en la primera amplificación, seguido del par 518/596 (79 pb) - en la orina de 8 de los 10 pacientes y en los controles positivos, pero no en los controles negativos.

La Tabla 1 indica la carga viral de cada uno de los pacientes que se analizaron, a partir de lo cual se puede inferir que en el caso de las muestras (números 2 y 3) que fueron negativos tras la amplificación, la carga viral fue menor de 50 copias de la virus por ml de plasma.

Tabla 1. Carga viral de los pacientes infectados por el VIH.

Núm. de paciente	Infección	Carga de VIH
1	VIH	120000
2	VIH	< 50
3	VIH	< 50
4	VIH	867
5	VIH	88000
6	VIH	8370

ES 2 410 598 T3

Núm. de paciente	Infección	Carga de VIH
7	VIH	32046
8	VIH + VHC	500000
9	VIH	15822
10	VIH + VHC	< 50

La carga viral se determinó mediante la medición de la cantidad de ARN específico de VIH por medio de RT-PCR en el plasma.

La sensibilidad aparente de la PCR anidada se evaluó mediante amplificación, con el mismo par de cebadores, un ADN genómico de la línea celular LAV 8E5 que portaba una sola copia integrada del genoma de VIH. Se determinó que la sensibilidad era de 5 equivalentes de genoma.

5

Lista de resumen de secuencias

- 10 GAG 468-F (SEQ ID NO: 1): TGGGTAAAAGTAATAGAGGAGAAGGC;
 GAG 602-R (SEQ ID NO: 2): AACATTTGCATGGCTGCTT;
 GAG 518-F (SEQ ID NO: 3): CAGCATTATCAGAAGGAGCCACC;
 GAG 596-R (SEQ ID NO: 4): TGCATGGCTGCTTGATGTCC.
 POL 4368-F (SEQ ID NO: 5): GGR*GAAGCCW*TGCATGGAC;
 POL 4468-R (SEQ ID NO: 6): GCTACATGR*ACTGCTACCAG;
 15 POL 4427-Rn (SEQ ID NO: 7): TGTRCAATCTARTTGCCATATY*CCTGG
 POL 4678-R (SEQ ID NO: 8): ACTCCY*TGR*CTTTGGGGATTG
 TAT 5955-F (SEQ ID NO: 9): GCTTAGGCATY*TCCTATGGCAG
 TAT 6462-R (SEQ ID NO: 10): TGGGGTCTGTK*GGTACACAGG
 TAT 6330-Fn (SEC ID NO: 11): CW*GHTAY*TATGGRGTACCTGTGTGG
 20 Los nucleótidos indicados por un asterisco (*) indican los nucleótidos degenerados conocidos por los expertos en la técnica.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para el diagnóstico de una infección viral en un sujeto, comprendiendo tal método la separación de una fracción libre de células de una muestra de orina de dicho sujeto y la detección de la presencia de uno o más ácidos nucleicos virales transrenal en dicha fracción libre de células, diagnosticando de ese modo un infección viral en dicho sujeto, en donde dicho ácido nucleico viral transrenal es un fragmento o fragmentos más pequeños de aproximadamente 1000 pares de bases o 1000 nucleótidos si está desnaturalizado.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichos ácidos nucleicos virales transrenal son ADN.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa de cuantificación de dichos ácidos nucleicos virales transrenales.
- 15 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicha cuantificación se lleva a cabo mediante un método seleccionado del grupo que consiste en el emparejamiento con sondas moleculares que son específicas para los agentes patogénicos, hibridación, PCR, PCR anidada, PCR semi-anidada, SSCP, LCR, y SDA.
- 20 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha separación se selecciona del grupo que consiste en filtración y centrifugación de dicha muestra de orina.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la longitud de dichos ácidos nucleicos virales transrenales es menor de aproximadamente 500 pares de bases.
- 25 7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichos ácidos nucleicos virales transrenales comprenden fragmentos de ADN, y la longitud de dichos fragmentos es entre aproximadamente 100 y aproximadamente 200 pb.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa de aislamiento o purificación de dichos ácidos nucleicos virales transrenales.
- 30 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha purificación se lleva a cabo a través de métodos químicos o físicos.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dichos aislamiento o la purificación se llevan a cabo utilizando un método seleccionado del grupo que consiste en extracción con disolventes orgánicos, filtración, precipitación, absorción sobre matrices sólidas que tienen afinidad por los ácidos nucleicos, y cromatografía.
- 35 11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dichas matrices sólidas consisten en resinas basadas en sílice, resinas de intercambio iónico, o hidroxiapatita.
- 40 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde dicha matriz sólida es una resina con una base de sílice, y dicho aislamiento o purificación se llevan a cabo en presencia de un agente caotrópico.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un tratamiento previo de la muestra de orina con uno o más agentes que inhiben la degradación de los ácidos nucleicos.
- 45 14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dichos agentes se seleccionan del grupo que consiste en agentes quelantes de iones, agentes desnaturalizantes, y detergentes iónicos.
- 50 15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde dichos agentes quelantes de iones son EDTA; dichos agentes desnaturalizantes son guanidina-HCl o isotiocianato de guanidina, y dichos detergentes iónicos son N-lauril sarcosina o dodecilsulfato de sodio.
16. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha detección de la presencia de dichos ácidos nucleicos virales transrenales se realiza a través de una técnica seleccionada del grupo que consiste en hibridación de los ácidos nucleicos, una reacción con sonda por ciclos, PCR, SSCP, LCR y SDA.
- 55 17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde dicha PCR es PCR anidada o semi-anidada.
18. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho ácido nucleico viral transrenal deriva de un virus con ARN o ADN.
- 60 19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde dicho virus es integrado o episómico.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde dicho virus se selecciona del grupo que consiste en VIH-1, VIH-2, virus de la viruela, virus de la polio, virus del herpes simple (VHS), virus de Epstein-Barr (VEB), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis B (VHB), y adenovirus (AAV) recombinantes y naturales.
- 5 21. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde dicho virus se selecciona del grupo que consiste en VEB y VIH-1.
22. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en donde dicho virus es el VIH-1.
- 10 23. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho ácido nucleico aislado o purificado se utiliza para la detección de dicho ácido nucleico viral transrenal.
24. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho método se lleva a cabo *in vitro* y dicho ácido nucleico viral es un ácido nucleico de VIH.
- 15 25. El método de acuerdo con la reivindicación 24, en donde dicha detección de dicho ácido nucleico viral transrenal se lleva a cabo a través de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
26. El método de acuerdo con la reivindicación 25, en donde dicha PCR es PCR anidada o semi-anidada.
- 20 27. El método de acuerdo con la reivindicación 25, en donde dicha reacción en cadena de la polimerasa se realiza utilizando uno o más cebadores que son específicos para el gen GAG o POL de VIH-1.
28. El método de acuerdo con la reivindicación 27, en donde los uno o más cebadores se seleccionan del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 1 a 11.
- 25 29. Un método para el seguimiento de una infección viral en un sujeto, comprendiendo tal método:
- 30 a) separar una primera fracción libre de células de una primera muestra de orina de dicho sujeto y cuantificar la cantidad de un ácido nucleico viral transrenal en dicha primera fracción libre de células;
- b) separar una segunda fracción libre de células de una segunda muestra de orina de dicho sujeto y cuantificar la cantidad de dicho ácido nucleico viral transrenal en dicha segunda fracción libre de células; y
- c) comparar la cantidad de dicho ácido nucleico viral transrenal en dicha primera y dicha segunda fracción libre de células,
- 35 controlando de ese modo dicha infección viral en dicho sujeto, en donde dicho ácido nucleico viral transrenal es un fragmento o fragmentos más pequeños que aproximadamente 1000 pares de bases o 1000 nucleótidos si está desnaturalizado.
30. El método de acuerdo con la reivindicación 29, en donde dicho sujeto está sometido a tratamiento con un compuesto que reduce o inhibe dicha infección viral.
- 40 31. El método de acuerdo con la reivindicación 30, en donde dicha infección viral es la infección por VIH y dicho compuesto es un agente anti-viral.
32. El método de acuerdo con la reivindicación 29, en donde dicha cuantificación se lleva a cabo mediante un método seleccionado del grupo que consiste en el emparejamiento con sondas moleculares que son específicas para los agentes patógenos, hibridación, PCR, PCR anidada, SSCP, LCR y SDA.
- 45 33. El método de acuerdo con la reivindicación 29, en donde dicha separación incluye la centrifugación de dicha muestra de orina.
- 50 34. El método de acuerdo con la reivindicación 29, en donde dichos ácidos nucleicos virales transrenales comprenden fragmentos de ADN, y la longitud de dichos fragmentos está entre aproximadamente 100 y aproximadamente 200 pb.
- 55 35. El método de acuerdo con la reivindicación 29, en donde dicho sujeto está en riesgo de desarrollar una infección viral recurrente.
- 60 36. Un kit para la determinación de la presencia de un ácido nucleico viral transrenal en una muestra de orina, en donde dicho ácido nucleico viral transrenal es un fragmento o fragmentos más pequeños que aproximadamente 1000 pares de bases o 1000 nucleótidos si ésta desnaturalizado, que comprende medios para el aislamiento o purificación de dicho ácido nucleico viral transrenal a partir de una fracción libre de células de una muestra de orina que comprende una matriz sólida y un agente que inhibe la degradación de dicho ácido nucleico viral transrenal, y medios para la determinación de la presencia de dicho ácido nucleico viral transrenal mediante hibridación con al menos una sonda específica para el virus.

37. El kit de acuerdo con la reivindicación 36, en donde dicha sonda específica para el virus comprende un cebador para la reacción en cadena de polimerización.

5 38. El kit de acuerdo con la reivindicación 37, en donde dicho cebador es específico para el gen GAG o POL del VIH-1.

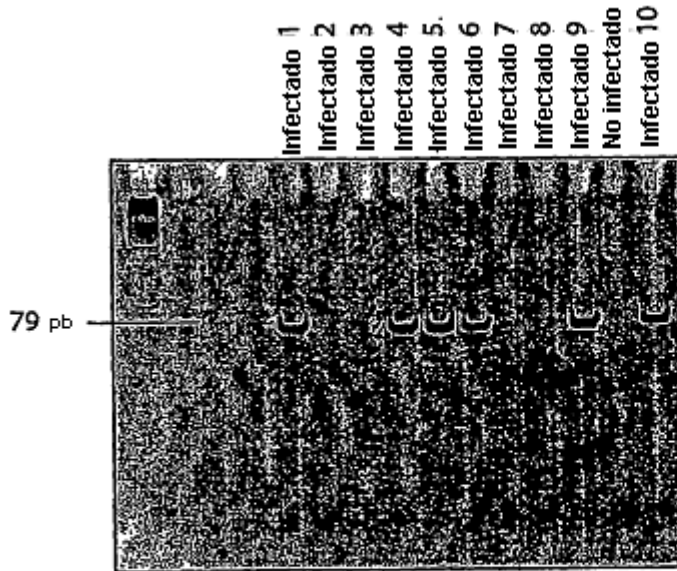


Fig. 1

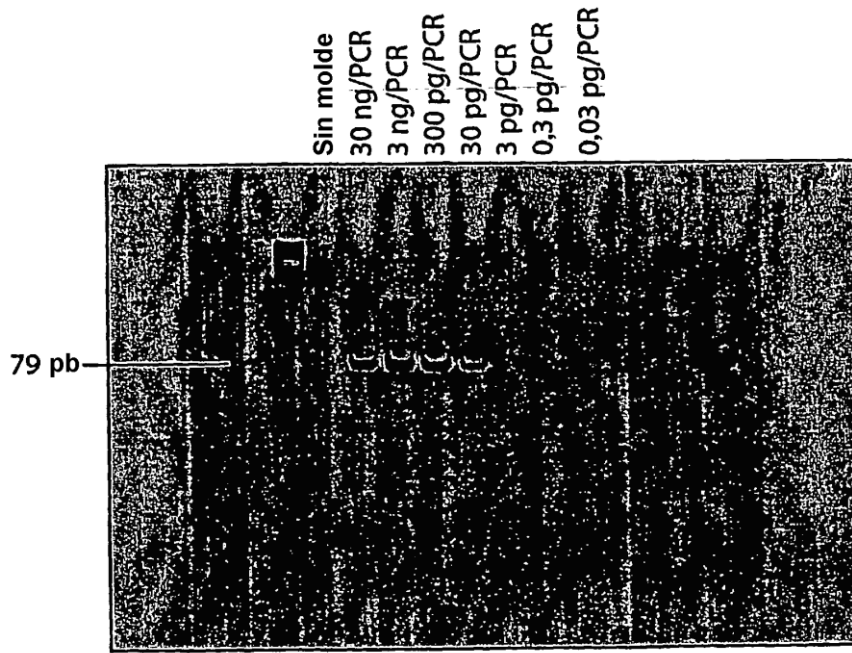


Fig. 2

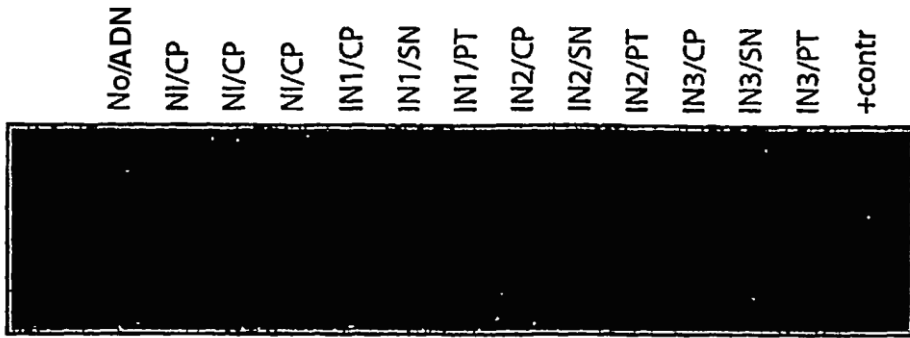


Fig. 3A

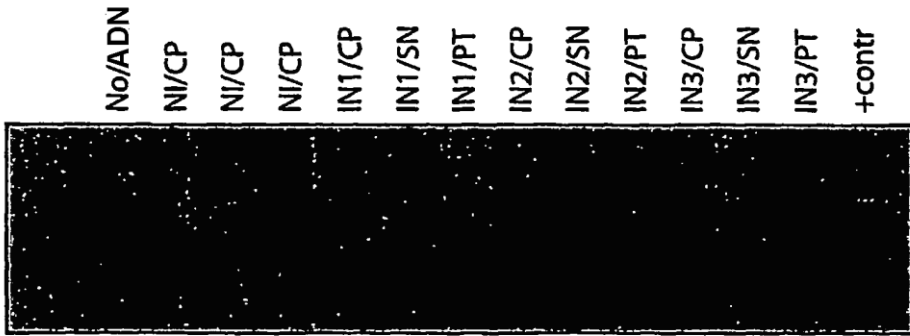


Fig. 3B

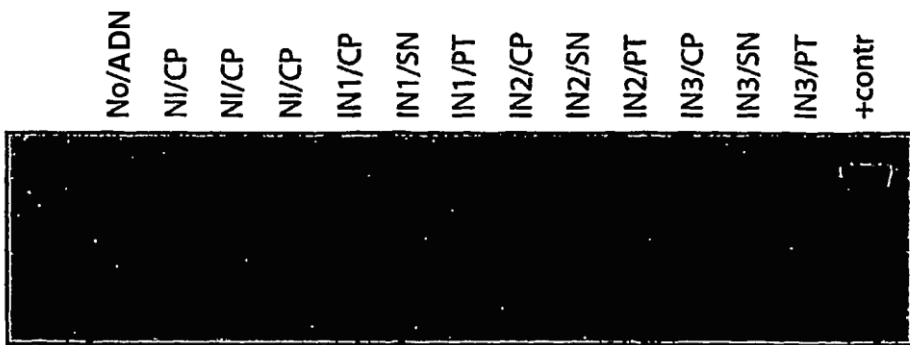


Fig. 3C