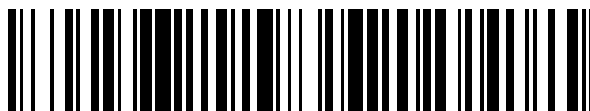


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 486 672**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2010** **E 10706249 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014** **EP 2403960**

54 Título: **Método inmunológico para detectar infección por JC activa**

30 Prioridad:

03.03.2009 EP 09154228

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.08.2014

73 Titular/es:

ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS
(50.0%)

3 Avenue Victoria
75004 Paris, FR y
UNIVERSITE PARIS-SUD 11 (50.0%)

72 Inventor/es:

TAOUFIK, YASSINE

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 486 672 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

Método inmunológico para detectar infección por JC activa

- 5 La invención se refiere a un método inmunológico para detectar una infección activa extrarrenal por el virus JC en un paciente candidato para un tratamiento con un tratamiento inmunosupresor o durante el transcurso de este tratamiento.
- 10 El uso creciente de anticuerpos monoclonales (AcM) usados para la inmunomodulación terapéutica en enfermedades autoinmunitarias está asociado con un aumento del riesgo de contraer de infecciones oportunistas, algunas de las cuales pueden ser potencialmente mortales.
- 15 Esto es particularmente cierto para la leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), cuyo agente causante, el poliomavirus JC (o VJC) puede, en determinadas condiciones de inmunosupresión local o sistémica, infectar activamente y destruir oligodendrocitos y astrocitos, conduciendo a zonas multifocales de desmielinización y grave disfunción neurológica asociada.
- 20 Se han notificado casos de LMP durante el transcurso del tratamiento de lupus con rituximab o psoriasis con efalizumab pero particularmente tras el tratamiento de esclerosis múltiple (EM) y enfermedad de Crohn tratadas con natalizumab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra la integrina $\alpha 4/\beta 1$ (VLA-4).
- El principal efecto secundario observado durante el tratamiento con natalizumab es la aparición de LMP, que se ha observado con una incidencia estimada de 1 por 1000 (Kappos L *et al.* 2007 Lancet Neurol. 6:431-41).
- 25 También se ha observado la aparición de LMP en pacientes tratados con efalizumab durante más de 3 años, y ha conducido a la suspensión de la autorización de comercialización de este AcM en Europa.
- 30 Un periodo de exposición prologada a AcM, una exposición previa a terapia inmunosupresora, una inmunodeficiencia (tal como una reducción de células T CD4) son probablemente factores contribuyentes, pero estos factores no están presentes necesariamente. Existen otros factores de riesgo, tal como factores genéticos relacionados con el huésped o el nivel de infección preexistente con el virus JC.
- 35 Por tanto, es importante poder identificar los sujetos en los que la exposición a AcM está asociada con un aumento del riesgo de desarrollar LMP. Esto mejoraría la seguridad de tal AcM. También es importante monitorizar pacientes tratados con AcM para determinar cualquier infección activa por el virus JC en el sistema nervioso central en un estadio temprano, para poder detener el tratamiento con AcM antes de la aparición de LMP y lesiones neurológicas irreversibles.
- 40 Desgraciadamente, poco hay que esperar de marcadores tales como ADN del virus JC en orina detectada mediante PCR) o la presencia de anticuerpos contra el virus JC en suero.
- 45 En efecto, el virus JC infecta a una mayoría de la población adulta con una replicación activa en células epiteliales renales asociadas con la excreción urinaria en una proporción sustancial de individuos infectados. La replicación activa del virus JC parece tolerarse en el riñón, por motivos que siguen sin determinarse (y no conduce necesariamente a generación de respuesta de células T efectoras detectable), pero no en tejidos extrarrenales y en particular en el SNC. Fuera del riñón, la detección de este virus es poco común en pacientes inmunocompetentes. En particular, la detección del virus en el líquido cefalorraquídeo tiene una especificidad muy alta con respecto al diagnóstico de LMP.
- 50 En una serie de adultos sanos con el virus JC, no se detectó respuesta efectora de células T CD8 frente al virus JC en la sangre. Sin embargo, se detectó este tipo de respuesta en el 67% en una cohorte de pacientes infectados por VIH con LMP. En caso de grave inmunodepresión, puede aumentar el riesgo de una replicación viral significativa en el SNC posteriormente a la disminución de la presión inmunitaria sobre los virus preexistentes en el SNC o a la invasión del SNC desde reservorios periféricos.
- 55 Gasnault *et al.* (AIDS 17, 2003, 1443-49) describen una prueba de proliferación de células T tras la activación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con VJC purificado durante 7 días. Esta prueba hace posible detectar células T CD4 de memoria centrales, que secretan IL-2, y proporcionan ayuda a las células T CD8, tras la reactivación de antígeno. Esta prueba es de particular interés en pacientes con VIH, ya que estos pacientes presentan una reducción de células T de memoria centrales CD4 y una pérdida de respuestas proliferativas de células T frente a antígenos de recuerdo tales como tuberculina, citomegalovirus, candidina (de *Candida albicans*) y similares. Esta prueba detecta células de memoria centrales incluyendo células quiescentes, cuya presencia señala a un contacto con VJC. Esto puede representar una infección antigua, una infección reciente o una infección en curso. En este artículo, se usa la detección del virus JC en orina como marcador de la susceptibilidad a la infección, en ausencia de pruebas serológicas que puedan utilizarse.
- 60
- 65

Khalili *et al* (Neurology 68, 2007, 985-90) describen el estado de la técnica con relación a VJC y el desarrollo de LMP. Los autores describen en particular las relaciones entre VJC y el sistema inmunitario. Este documento que una respuesta inmunitaria celular, en particular de linfocitos T citotóxicos, es importante para controlar el virus. En el párrafo relacionado con los métodos de detección de VJC, los autores sólo citan la detección de la carga viral mediante PCR en la muestra del paciente.

Weber *et al* (Ann Neurol 49, 2001, 636-42) estudiaron la respuesta humoral y celular frente a LMP en pacientes negativos o positivos para VIH que tienen LMP o no. Se ha estudiado la proliferación de PBMC y su capacidad para producir interferón gamma e IL-10 tras la estimulación con partículas pseudovirales de VJC, que expresan la proteína VP1. Los autores indican claramente que no existe ninguna correlación entre la proliferación de PBMC o la producción de citocinas y la presencia de ADN de VJC en PBMC (página 640, columna derecha). Además, la proliferación de PBMC es menor en pacientes con LMP que en pacientes no infectados. Se observa proliferación de las PBMC tras la sensibilización con el antígeno durante 4 días (página 638, columna izquierda), de modo que Weber *et al* investigan las células T de memoria centrales CD4.

Petrovsky y Harrison (J Immunol Methods. 186, 1995, 37-46) describen un ensayo para detectar células T activadas en sangre, mediante la medición de citocinas en sangre completa.

Natalizumab, a través de su unión a VLA-4, bloquea el tráfico de linfocitos T activados (ya sean autorreactivos o estén dirigidos contra agentes infecciosos) desde el sistema nervioso periférico al central. Sin embargo, el efecto de este anticuerpo sobre la activación periférica de estas células, a través de células dendríticas que presentan antígenos del SNC, y que circulan desde el parénquima cerebral hasta los ganglios linfáticos cervicales, no se determina claramente y se postula que la actividad viral en el SNC puede identificarse indirectamente en la periferia a través de la detección de respuestas de células T efectoras específicas del virus JC.

Por tanto, la invención se refiere a un método de detección de infección extrarrenal por el virus JC, particularmente en el sistema nervioso central de un paciente candidato para un tratamiento inmunosupresor, que comprende la etapa de:

a) examinar la presencia de linfocitos T activados (efectores) frente al virus JC en una muestra de sangre de dicho paciente, mediante la exposición de dicha muestra de sangre a epítopos del virus durante hasta 48 horas.

En efecto, la presencia de tales linfocitos T activados indicará infección por el virus JC en el sistema nervioso central.

En el contexto de la presente divulgación, un tratamiento inmunosupresor consiste en la administración de una sustancia que reducirá el número, la actividad o el tráfico de células del sistema inmunitario.

En particular, un tratamiento inmunosupresor es de particular interés para pacientes que tienen una enfermedad autoinmunitaria, tal como psoriasis, lupus, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn o esclerosis múltiple.

Tales sustancias que pueden utilizarse en un tratamiento inmunosupresor incluyen:

- Agentes citostáticos (tales como mostazas nitrogenadas (ciclofosfamida), nitrosoureas, compuestos de platino, análogos de ácido fólico, tales como metotrexato, análogos de purina tales como azatioprina y mercaptopurina, análogos de pirimidina, inhibidores de la síntesis de proteínas o antibióticos citotóxicos tales como dactinomycin, antraciclinas, mitomicina C, bleomicina o mitramicina), que inhiben la división celular y, por tanto, se usan habitualmente para tratar cáncer, y pueden usarse en un tratamiento inmunosupresor (en menores dosis que en el tratamiento de enfermedades malignas) para inhibir la proliferación de T células y/o B.

- Fármacos que actúan sobre inmunofilinas tales como ciclosporina, tacrolimus, sirolimus que también pueden usarse en un tratamiento inmunosupresor.

- Anticuerpos que se usan a veces como una terapia inmunosupresora rápida y potente para prevenir reacciones de rechazo agudas así como un tratamiento dirigido de trastornos linfoproliferativos o autoinmunitarios (por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-CD20).

En una realización preferida, dicha sustancia es un anticuerpo monoclonal. Se dirigen anticuerpos particulares contra CD11 (tales como efalizumab vendido como Raptiva™ por Genentech y Merck Serono), CD20 (tales como rituximab, vendido como Rituxan™ y MabThera™ por Biogen Idec, Serono y Roche).

Un anticuerpo monoclonal particular que puede utilizarse para inducir un tratamiento inmunosupresor es natalizumab (vendido como Tysabri™ por Biogen Idec y Elan) que se dirige contra la molécula de adhesión celular integrina $\alpha 4$ (integrina $\alpha 4/\beta 1$, VLA-4).

Ha de observarse que dicha sustancia puede administrarse por sí misma, o junto con otra sustancia que también

modulará la respuesta inmunitaria, tal como otro AcM, o una citocina, tal como interferón β -1a o un fármaco inmunosupresor.

5 En una realización preferida, se realiza dicho examen mediante la detección de la producción de al menos una citocina inflamatoria por dichos linfocitos T tras la presentación de epítopos del virus JC a dichos linfocitos.

En un ejemplo alternativo, se realiza dicho examen mediante la detección de un aumento del ARNm para al menos una citocina inflamatoria en dichos linfocitos activados (en comparación con linfocitos no activados). Esto puede realizarse mediante transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

10 Las secuencias de diversas citocinas se conocen en la técnica y kits para detectar citocinas están disponibles comercialmente.

15 También están disponibles ensayos para aislar ARNm y realizar RT-PCR. Se han descrito procedimientos de RT-PCR cuantitativos en Taoufik Y *et al.*, Blood 1997 89:2842-8; Taoufik Y *et al.*, Eur cyto netw 1998 9:197-204; Durali D *et al.*, Blood. 2003 102:4084-9. Puede determinarse el nivel de ARNm de citocinas (tales como IFN- γ , IL-10, IL-4, TGF- β 1) mediante la técnica de PCR en tiempo real con la química de TaqMan o el ciclador de luz tal como se describe en las referencias anteriores.

20 El presente método hace posible identificar una respuesta inmunitaria de linfocitos T efectores frente al virus JC, en la periferia, que está vinculada con la presencia de una actividad de virus JC fuera del riñón (y en particular de una actividad de virus JC en el SNC).

25 La detección de los linfocitos T activados se realiza tras una breve exposición (en un plazo de aproximadamente 24 horas) a los epítopos del virus.

El tiempo de exposición debe llegar a las 48 horas, pero un tiempo de exposición más breve reflejará la presencia de linfocitos T activados en la muestra de sangre recogida. Por tanto, el tiempo de exposición será preferiblemente de entre 12 y 36 horas, más preferiblemente de entre 14 y 24 horas, lo más preferiblemente de entre aproximadamente 16 y 20 horas.

30 El método tiene como objetivo la detección de células T efectoras activadas *in vivo* (células T cooperadoras) que están presentes en la muestra de sangre. La presencia de tales células supone la existencia de una infección por virus JC activa. La incubación de la muestra del paciente con los epítopos del virus no será por tanto demasiado larga, ya que una incubación durante largo tiempo (unos cuantos días o semanas) podría conducir a la detección de células T de memoria en reposo, cuya presencia no reflejaría una infección activa.

35 Por tanto, esta prueba (detección de citocinas tras una breve activación con virus JC purificado) hace posible detectar células efectoras, secretar dichas citocinas, pero que tienen una capacidad reducida para proliferar, y ayudar a los linfocitos T CD8, a diferencia de las células de memoria centrales. Se han activado estas células *in vivo* por el antígeno, y por tanto vuelven a estimularse *in vitro* durante un breve periodo de tiempo. La presencia de estas células efectoras refleja la presencia de una infección sistémica activa.

45 En un ejemplo preferido, dichos epítopos se presentan a dichos linfocitos mediante la exposición de dichos linfocitos a virus JC purificado. El uso de un virus completo (en vez de epítopos o antígenos individuales) hace posible tener en cuenta todos los epítopos virales. En particular, el uso de VJC purificado también permite la activación de células T CD4 a través de la presentación de todos los posibles epítopos de virus restringidos de CMH de clase II por monocitos tras la internalización de partículas virales completas.

50 Cuando se usan epítopos o antígenos individuales, o virus completo, se presentan preferiblemente epítopos peptídicos virales a los linfocitos T por células presentadoras de antígenos (APC), tales como monocitos:macrófagos o células dendríticas. Estos epítopos/antígenos podrían añadirse directamente en una muestra de sangre completa o incubarse en primer lugar con dichas APC antes de la incubación conjunta de las APC y los linfocitos T.

55 En un ejemplo preferido, dicha citocina es una citocina vinculada con respuestas inmunológicas de tipo Th-1.

Por tanto, la citocina está comprendida preferiblemente en el grupo que consiste en interferón gamma (IFN- γ), e interleucina 2 (IL-2) y similares.

60 La producción de la citocina por los linfocitos T activados se detecta mediante cualquier método conocido en la técnica. En particular, se posible detectar la presencia de la citocina en el sobrenadante mediante ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), método relacionado con citometría de flujo (tal como el desarrollado por Luminex®), mediante el procedimiento ELISPOT (mancha de inmunoabsorción ligada a enzimas) o de manera intracelular mediante citometría de flujo. Están disponibles kits para la detección mediante ELISA en la técnica, y
65 pueden obtenerse, en particular para IFN- γ , de Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU. (kit para ELISA de interferón

gamma (IFN gamma) humano de Thermo Scientific Pierce), o de Abcam, Cambridge, MA, EE.UU. (kit para ELISA de interferón gamma humano - 2 x placas de 96 pocillos (ab46045)). También pueden obtenerse kits para detectar la producción o expresión intracelular de IFN- γ , y diversas interleucinas de otros proveedores (tales como MabTech, R&D Systems, Becton Dickinson, Milteny Biotech, Coulter Immunotech...).

5 La presencia de controles positivos (con PHA, fitohemaglutinina) y negativos (sin virus) hace posible determinar el aumento real en la producción de la citocina con la presencia del virus y permite el control de la validez del procedimiento.

10 En una primera realización, se realiza dicho examen con dicha muestra de sangre. En otro ejemplo, se realiza dicho examen con las células nucleares presentes en la muestra de sangre. En otra realización, se realiza dicho examen con células de monocitos de sangre periférica (PBMC) aislados, o con linfocitos T aislados de dicha muestra de sangre.

15 Pueden aislarse PBMC mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los CPT (tubos de preparación de célula) o la separación mediante Ficoll. Se describen métodos que pueden utilizarse en Nilsson *et al.* (Clin Vaccine Immunol. abril de 2008; 15(4): 585-589).

20 Pueden aislarse células CD4+ y CD8+ de sangre periférica completa mediante separación con perlas inmunomagnéticas (Dynabeads, Dynal Biotech, Oslo, Noruega).

El método también puede comprender la etapa de b) recoger dicha muestra de sangre de dicho paciente antes de la etapa a).

25 El método de la invención puede completarse cuando comprende además la etapa de examinar o cuantificar la presencia del virus JC en una muestra de líquido cefalorraquídeo de dicho paciente. Esto confirmaría el primer diagnóstico obtenido mediante la presencia de linfocitos T activados contra el virus JC en la periferia.

30 Puede realizarse la búsqueda de ADN de JC viral en líquido cefalorraquídeo mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o ensayo de PCR cuantitativo. Ha de observarse que, aunque se conoce este método en la técnica, no es aplicable a gran escala y de manera rutinaria, ya que es muy invasivo para el paciente (es necesario recoger líquido cefalorraquídeo). Esta segunda etapa b) se usa por tanto preferiblemente sólo en pacientes que presentan linfocitos T activados.

35 Se describen métodos para detectar el virus JC en líquido cefalorraquídeo en Weber *et al.* (1994, Aids 8, 49-57), Fong *et al.* (1995, J. Clin. Microbiol., 33, 484-486), McGuire *et al.* (1995, Ann. Neurol. 37, 395-399; la fe de erratas publicada aparece en Ann. Neurol. (1995) 37, 687)).

40 Se describe un método para cuantificar ADN de VJC en Taoufik *et al.*, J Inf Dis (1998).178, 1816 o en Taoufik Y *et al.*, AIDS (2000) 14:758-9

El método de la invención puede realizarse en pacientes que no habían recibido aún un tratamiento inmunosupresor, para determinar si están en riesgo de desarrollar LMP tras el tratamiento.

45 También puede realizarse en pacientes que ya están recibiendo un tratamiento inmunosupresor, para determinar si presentan realmente infección por el virus JC activa extrarrenal en particular en el SNC. En caso de que se detecte la presencia de linfocitos T activados (que indica la presencia de infección por el virus JC), debe suspenderse o interrumpirse el tratamiento inmunosupresor.

50 Si no se detectan linfocitos T activados, no está presente infección, y el tratamiento inmunosupresor puede por tanto iniciarse o continuarse.

La repetición regular del método de la invención hace posible monitorizar el riesgo de infección con el virus JC durante el transcurso de un tratamiento inmunosupresor, y en particular tratamiento con natalizumab.

55 También es de interés en pacientes que presentan un signo o síntoma de leucoencefalopatía multifocal progresiva.

El método de la invención también puede realizarse antes y/o después de haber evaluado el paciente mediante una exploración mediante obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM).

60 La divulgación también se refiere al uso de epítopos de VJC (virus purificado completo o epítopos o antígenos individuales) como epítopos de sensibilización, para detectar células T efectoras activadas en una muestra de sangre de un paciente, en el que dicho paciente es candidato para un tratamiento inmunosupresor.

65 La divulgación también se refiere a un kit que contiene epítopos de VJC y medios para medir una citocina de tipo TH-1, tal como interferón gamma o interleucina-2. Tal como se mencionó anteriormente, puede usarse virus

purificado completo o epítomos o antígenos individuales.

Ejemplo

5 Procedimiento técnico

Se usa virus JC purificado: cepa MAD-4, ATCC VR-1583 purificado mediante centrifugación diferencial y vendido por LGC standard, Molsheim, Francia) titulado a $10^{5,75}$ correspondiente a una TCID₅₀/0,2 ml en 7 días con células COS-7 (ATCC CRL-1651).

10 Se usan 10 µl de esta preparación para la presentación a 200.000 PBMC.

Se recogen 5 ml de sangre de un paciente y se mezclan con EDTA para impedir la coagulación. Se divide esta muestra en alícuotas de 1 ml cada una.

15 Se añaden 50 µl de virus purificado a una primera alícuota. Se añade 1 µg de PHA a la segunda alícuota para producir un control positivo, mientras que una tercera alícuota corresponde al control negativo.

20 Se realiza la incubación a 37°C durante 18 horas y entonces se centrifugan las muestras a 4000 RPM.

Se recoge el plasma y se determina el contenido de IFN gamma mediante ELISA, ELISPOT o mediante un procedimiento relacionado con citometría (Luminex®).

25 Como alternativa, puede usarse virus JC de tipo natural que puede obtenerse de líquido cefalorraquídeo de pacientes con LMP y cultivarse en células de la glía embrionarias humanas.

Para detectar la producción de IFN gamma, también es posible destruir los glóbulos rojos y marcar las células con anticuerpos anti-CD3/CD4/CD8. Entonces se detecta IFN gamma con las células tras permeabilizarse éstas. También es posible sembrar en placa PBMC activadas sobre placas recubiertas con anticuerpo anti-IFN-γ luego numerar las células productoras de IFN-γ tras un procedimiento de ELISPOT.

30 Las referencias útiles comprenden Major *et al.*, (J Virol 1987, 61:1435-1441), Frye *et al.*, (J Virol Methods 1997, 63:81-92), Gasnault *et al.*, (AIDS. 4 de julio de 2003; 17(10):1443-9.).

REIVINDICACIONES

1. Método de detección de infección activa extrarrenal por virus JC, particularmente en el sistema nervioso central de un paciente candidato para un tratamiento inmunosupresor, que comprende la etapa de:
- 5 a) examinar la presencia de linfocitos T activados frente al virus JC en una muestra de sangre de dicho paciente, mediante la exposición de dicha muestra de sangre a epítomos del virus durante hasta 48 horas.
2. Método según la reivindicación 1, en el que se realiza dicho examen mediante detección de producción de al menos una citocina inflamatoria por dichos linfocitos T tras la presentación de epítomos del virus JC a dichos linfocitos.
- 10 3. Método según la reivindicación 2, en el que se presentan que dichos epítomos a dichos linfocitos mediante la exposición de dichos linfocitos a virus JC purificado.
- 15 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, en el que dicha citocina está comprendida en el grupo que consiste en interferón gamma e interleucina 2.
- 20 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que se detecta dicha citocina mediante ELISA, ELISPOT o citometría de flujo.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se realiza dicho examen directamente en dicha muestra de sangre completa.
- 25 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se realiza dicho examen en monocitos de sangre periférica aislados o linfocitos T aislados de dicha muestra de sangre.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que se expone dicha muestra de sangre a epítomos del virus entre 12 y 36 horas.
- 30 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además la etapa de:
- b) examinar o cuantificar la presencia del virus JC en una muestra de líquido cefalorraquídeo de dicho paciente.
- 35 10. Método según la reivindicación 9, en el que se realiza la etapa b) mediante PCR o ensayo de PCR cuantitativo.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho tratamiento inmunosupresor comprende la administración de un anticuerpo monoclonal tal como natalizumab o efalizumab.
- 40 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho paciente no había recibido dicho tratamiento inmunosupresor antes de la etapa a).
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho paciente estaba recibiendo dicho tratamiento inmunosupresor antes de la etapa a).
- 45 14. Método de monitorización del riesgo de infección con el virus JC durante el transcurso de un tratamiento inmunosupresor, que comprende la etapa de repetir regularmente el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, durante el transcurso de dicho tratamiento.
- 50 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dicho paciente presenta un signo o síntoma de leucoencefalopatía multifocal progresiva.