

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 426**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2013 PCT/US2013/023618**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13116210**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2013 E 13744099 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2810071**

54 Título: **Método para detectar la reactivación de poliomavirus**

30 Prioridad:

30.01.2012 US 201261592402 P

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

18.03.2019

73 Titular/es:

**TEMPLE UNIVERSITY - OF THE
COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER
EDUCATION (100.0%)
Broad Street and Montgomery Avenue
Philadelphia, PA 19122, US**

72 Inventor/es:

**KHALILI, KAMEL y
SARIYER, ILKER, K.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 704 426 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 para detectar la reactivación de poliomavirus

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a la detección de la reactivación de poliomavirus y a la valoración del riesgo de desarrollar enfermedades inducidas por poliomavirus.

Antecedentes de la invención

10 Polyomavirus es el género de los virus en la familia Polyomaviridae. Se han descubierto nueve poliomavirus en humanos: JCV, BKV, virus KI y virus WU, poliomavirus de las células de Merkel (MCV), poliomavirus asociado a Trichodysplasia sinulosa (TSV), HPyV6, HPyV7 y HPyV9. Entre estos poliomavirus humanos, JCV, BKV y MCV causan serias complicaciones y enfermedades. Se muestra que MCV causa una rara, aunque seria, forma de cáncer de piel, el carcinoma de células de Merkel. BKV produce una seria infección de los riñones de pacientes de trasplante inmunosuprimidos, lo que constituye una base significativa de pérdida de injerto. BKV tiene una gran prevalencia en la población humana y establece una infección latente persistente a lo largo de toda la vida, típicamente sin síntomas clínicos.

15 Entre los poliomavirus humanos, JCV es poliomavirus más abundante, que infecta a más del 80% de la población humana durante la niñez (también típicamente sin síntomas clínicos), y establece una infección latente persistente a lo largo de toda la vida. La reactivación de JCV, que se replica en las células gliales del cerebro, puede causar la fatal enfermedad desmielinizante, la leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), que habitualmente se ve en pacientes con afecciones inmunocomprometidas subyacentes, notablemente entre pacientes de SIDA y aquéllos que están con regímenes inmunosupresores crónicos.

20 Es poco lo que se sabe acerca de la progresión de la LMP, ya que no hay ningún biomarcador para la detección de la reactivación e infección por el JCV en los individuos afectados. La mayoría de los casos de LMP son diagnosticados en pacientes en un estadio tardío de la enfermedad tras la aparición de las complicaciones neurológicas. No existen marcadores diagnósticos establecidos aplicables a la clínica para predecir qué pacientes desarrollarán la enfermedad.

25 Los Polyomavirus, tales como JCV, son virus de ADN de doble hélice no envueltos. El ADN comprende una región codificante temprana y una región codificante tardía. La región temprana codifica dos oncoproteínas, denominadas antígeno T grande (T-Ag) y antígeno t pequeño (t-Ag). La región tardía codifica tres proteínas de la cápside, VP1, VP2 y VP3. Se ha explorado la detección de ADN de poliomavirus y/o de anticuerpos antipoliomavirus en fluidos corporales como posibles métodos de diagnóstico de la reactivación de poliomavirus. Sin embargo, debido a la infección persistente a lo largo de toda la vida, dichos métodos han mostrado ser algo poco fiables.

30 En un subgrupo de los poliomavirus, la región tardía también codifica una pequeña proteína reguladora llamada agnoproteína. La agnoproteína desempeña un papel en la regulación de la expresión y replicación de los genes víricos, y en la modulación de algunas funciones de las células huésped (véase, p. ej., Khalili *et al.*, J Cell Physiol. 204:1-7, 2005). La agnoproteína es una pequeña proteína de la membrana integral y se produce tardíamente en el ciclo infeccioso (véase, p. ej., Suzuki *et al.*, PLoS Pathog 6(3):e1000801 doi:10.1371/journal.ppat.1000801, 2010). En muestras de tejido cerebral de pacientes con LMP, se detecta la agnoproteína en el área perinuclear y en la región citoplásmica de las células en lesiones desmielinizadas, pero no se detectó en áreas normales de los tejidos cerebrales LMP o en cerebros normales (Okada *et al.*, Acta Neuropathol 104:130-136, 2002). Estos datos condujeron a la idea de que dicha detección de agnoproteína puede ser útil para el diagnóstico de la LMP (Okada *et al.*, 2002, *supra*). Una biopsia de tejido es una técnica invasiva y se asocia a dolor, así como a riesgo de infección, hemorragia, daños en el tejido sano y complicaciones relacionadas.

35 Leuenberger *et al.*, Clinical and Vaccine Immunology (2007) 959-968, describen un estudio de la expresión de la agnoproteína del virus BK en muestras de biopsias renales de pacientes de trasplante de riñón y la comparación de las respuestas inmunes humoral y celular contra la proteína tanto en pacientes de trasplante de riñón como en controles sanos, para concluir que la agnoproteína del virus BK, aunque se expresa abundantemente *in vivo*, se reconoce de manera pobre inmunológicamente.

40 Del Valle *et al.*, Cancer (2005) 103:516-527, describen la detección del ADN del virus JC y la expresión del antígeno T y la agnoproteína del virus en el carcinoma esofágico.

45 Bialasiewicz *et al.*, Journal of Clinical Virology (2009) 45:249-254, comparan la presencia de virus JC, BK, WU y KI en una variedad de muestras de pacientes.

50 Guillaume *et al.*, European Journal of Neurology (2000) 7:101-106, es un informe de caso sobre la detección de JCV en un paciente con LMP demostrada por biopsia.

Lo que se necesita es un método simple y fácil para la detección de la reactivación y la infección activa de poliomavirus en pacientes con riesgo, por ejemplo, de desarrollar enfermedades inducidas por poliomavirus, incluyendo, aunque

sin limitación, LMP.

Compendio de la invención

La invención se basa en el descubrimiento de que la agnoproteína de poliomavirus es segregada por células que tienen una infección activa por poliomavirus y puede detectarse en fluidos corporales, tales como sangre, orina y líquido cefalorraquídeo.

En una realización, la invención proporciona un método *in vitro* para detectar una infección activa por poliomavirus en un paciente, comprendiendo el método: determinación de la presencia o ausencia de una agnoproteína de poliomavirus en una muestra biológica, que comprende sangre, suero sanguíneo, líquido cefalorraquídeo u orina, obtenida del paciente, en donde la presencia de la agnoproteína de poliomavirus en una muestra biológica que comprende sangre, suero sanguíneo o líquido cefalorraquídeo es indicativa de una infección activa por el virus JC en el paciente, y la presencia de agnoproteína de poliomavirus en una muestra biológica que comprende orina es indicativa de una infección activa por el virus BK en el paciente.

En un aspecto, el método para detectar una infección activa por poliomavirus comprende además la medición del nivel de la agnoproteína de poliomavirus en la muestra biológica, y la comparación del nivel de la agnoproteína de poliomavirus en la muestra biológica con el nivel de agnoproteína de poliomavirus en una muestra de control. Un nivel elevado de la agnoproteína de poliomavirus en la muestra biológica con relación al nivel de agnoproteína de poliomavirus en la muestra de control es indicativo de una infección activa por el virus JC o el virus BK en el paciente.

En otra realización, la invención proporciona un método de monitorización de una infección por poliomavirus en un paciente diagnosticado de una infección activa por poliomavirus. El método comprende la etapa de valoración del nivel de una agnoproteína de poliomavirus en una primera muestra biológica del paciente para obtener un nivel basal, en donde dicha muestra biológica comprende sangre, suero sanguíneo, líquido cefalorraquídeo u orina. El método comprende además la etapa de valoración del nivel de agnoproteína de poliomavirus en una segunda muestra biológica que comprende sangre, suero sanguíneo, líquido cefalorraquídeo u orina del paciente para obtener un segundo nivel, en donde se obtiene la segunda muestra biológica del paciente en un segundo tiempo. Si el segundo nivel de agnoproteína de poliomavirus en una muestra biológica que comprende sangre, suero sanguíneo o líquido cefalorraquídeo de un paciente infectado con virus JC es mayor que el nivel basal, la infección por el virus JC en el paciente ha progresado. Si el segundo nivel de agnoproteína de poliomavirus en una muestra biológica que comprende orina de un paciente infectado con virus BK es mayor que el nivel basal, la infección por el virus BK en el paciente ha progresado.

En aún otra realización, la invención proporciona un método para valorar el riesgo de desarrollar una enfermedad asociada a un virus JC o un virus BK en un paciente humano con riesgo de desarrollar dicha enfermedad. El método comprende la determinación de la presencia o ausencia de una agnoproteína de poliomavirus en una muestra biológica que comprende sangre, suero sanguíneo o líquido cefalorraquídeo obtenida del paciente, o la determinación de la presencia o ausencia de una agnoproteína de poliomavirus en una muestra biológica que comprende orina obtenida del paciente. La presencia de la agnoproteína de poliomavirus en la sangre, el suero sanguíneo o el líquido cefalorraquídeo es indicativa de un mayor riesgo de desarrollar uno o más de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), meduloblastoma, oligodendroglioma, astroglioma, glioblastoma y cáncer de colon. La presencia de la agnoproteína de poliomavirus en la muestra de orina es indicativa del desarrollo de uno o más de nefritis, nefropatía y cáncer de próstata.

También se describe aquí un kit para detectar una agnoproteína de poliomavirus en una muestra biológica. El kit comprende (a) un conjunto de reactivos que detecta específicamente para la detección de una agnoproteína de poliomavirus, y (b) instrucciones para usar el kit para la detección de agnoproteína de poliomavirus y/o anticuerpos contra agnoproteínas en un fluido corporal seleccionado del grupo consistente en sangre, suero sanguíneo, plasma sanguíneo y orina. El kit es útil para la detección de la reactivación de poliomavirus, detectando o monitorizando una infección activa por poliomavirus o valorando o monitorizando el riesgo de desarrollar una enfermedad asociada a un poliomavirus en una muestra biológica, en donde la muestra biológica es un fluido corporal.

En algunas realizaciones de la invención, la detección de una agnoproteína de poliomavirus comprende un ensayo basado en anticuerpos, un ensayo basado en aptámeros, un ensayo de receptor y ligando, un ensayo de actividad enzimática y/o un ensayo de unión de reguladores alostéricos.

Breve descripción de las Figuras

La Fig. 1 es una transferencia de western de la detección de agnoproteína en el medio de crecimiento de células SVG-A infectadas con la cepa Mad-1 del virus JC. La agnoproteína es expresada por las células infectadas (calle 1) y está presente en los medios de crecimiento (calle 4, 10 días postinfección; calle 5, 20 días postinfección). También se muestran en la Fig. 1 los resultados para suero normal de conejo (calle 3, IP-NRS), y los controles positivo (calle 1) y negativo (calle 2). Se marcan las cadenas pesadas (AB-Hc) y ligeras (AB-Lc) del anticuerpo usado en el ensayo.

La Fig. 2 es una transferencia de western del medio de crecimiento del cultivo de células Tc620 de oligodendroglioma humano infectadas con adenovirus defectuoso en replicación codificante de agnoproteína JCV. La agnoproteína se

5 inmunoprecipitó del medio de crecimiento con un anticuerpo específico para agnoproteína (IP-Agno, calle 4), pero no con suero normal de conejo (IP-NRS, calle 3). Se usaron extractos de células enteras de células infectadas con virus que expresaba agnoproteína (calle 1) y células infectadas con adenovirus no codificante de agnoproteína (calle 2) como controles positivo y negativo, respectivamente. Se marcan las cadenas pesadas (AB-Hc) y ligeras (AB-Lc) del anticuerpo usado en el ensayo.

La Fig. 3A es un gráfico de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de agnoproteína en el medio de crecimiento celular suplementado con concentraciones crecientes de agnoproteína recombinante fusionada a MBP.

10 La Fig. 3B es un gráfico que muestra medios acondicionados de células que expresan agnoproteína y que dan positivo para la agnoproteína (Ad-agn), mientras que los medios condicionados de las células de control (Cont.) no mostraron reactividad.

15 La Fig. 4A muestra los resultados de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de agnoproteína de muestras humanas. Se detectó agnoproteína en el líquido cefalorraquídeo de un caso de LMP desarrollado en un paciente de VIH-SIDA (HIV/PML-CSF). Las muestras de suero de pacientes con EM también fueron positivas para agnoproteína en diferentes tiempos de extracción que representan diferentes estadios de la enfermedad (7A-D y 11A-D). Se usó agnoproteína recombinante a concentraciones de 10, 1 y 0,1 picogramos como control positivo (SS=10 pg agno; SS=1 pg agno; SS=0,10 pg agno). Se usaron una muestra de suero de un individuo sano (SS) y PBS (Neg-PBS x 2) como controles negativos del experimento.

La Fig. 4B muestra los resultados de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de agnoproteína de muestras de plasma, suero y orina humanos obtenidas de pacientes diagnosticados de nefropatía por BKV.

20 Definiciones

Tal como se utilizan aquí, cada uno de los términos siguientes tiene el significado que se le asocia en esta sección.

Los artículos "un" y "una" son aquí utilizados para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

25 El término "aproximadamente" será comprendido por personas con conocimientos ordinarios en la técnica y variará en alguna medida dependiendo del contexto en el que se utilice. Tal como se usa aquí, "aproximadamente" pretende incluir variaciones del $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferiblemente $\pm 5\%$, incluso más preferiblemente $\pm 1\%$, y aún más preferiblemente $\pm 0,1\%$.

30 A menos que se especifique aquí algo diferente, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" incluyen ampliamente formas naturales de anticuerpos (p. ej., IgG, IgA, IgM, IgE) y anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos de una sola cadena, anticuerpos quiméricos y humanizados y anticuerpos multiespecíficos, así como fragmentos y derivados de todos los anteriores, teniendo dichos fragmentos y derivados al menos un sitio de unión antigénica. Los derivados de anticuerpos pueden comprender una proteína o un resto químico conjugado a un anticuerpo.

35 Tal como se utiliza aquí, un "material instructivo" incluye una publicación, un registro, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que pueda estar en el kit para determinar la progresión de una enfermedad. El material instructivo del kit puede, por ejemplo, estar unido a un envase que contiene un reactivo aquí descrito o ser enviado junto con un envase que contiene un reactivo. De manera alternativa, el material instructivo puede ser enviado por separado del envase con la intención de que el material instructivo y el reactivo sean usados cooperativamente por el receptor.

40 "Medir" o "medición", o de manera alternativa "detectar" o "detección", o de manera alternativa "determinar" o "determinación", significa valorar la presencia, ausencia, cantidad o cantidad de (?) una sustancia dada en una muestra clínica o derivada de un sujeto, incluyendo la derivación de niveles de concentración cualitativos o cuantitativos de dichas sustancias.

"Muestra" o "muestra biológica", tal como se utiliza aquí, significa un material biológico aislado de un individuo. La muestra biológica puede contener cualquier material biológico adecuado para detectar el biomarcador deseado.

45 "Se une específicamente", tal como se utiliza aquí en los contextos de un anticuerpo, se refiere a la unión de anticuerpos a un antígeno predeterminado con una preferencia que permite usar el anticuerpo para distinguir el antígeno de otros en una medida que permita los ensayos aquí descritos.

Tal como se utiliza aquí, el término "sujeto" o "paciente" se refiere a cualquier animal (p. ej., un mamífero), incluyendo, aunque sin limitación, humanos, primates no humanos, roedores y similares. Típicamente, se usan aquí los términos "sujeto" y "paciente" indistintamente para hacer referencia a un sujeto humano.

50 Tal como se utiliza aquí, un "sujeto normal" o "sujeto de control" se refiere, dependiendo del contexto, a un sujeto que no sufre de enfermedad inducida por poliomavirus o a un sujeto que no sufre de una infección activa por poliomavirus.

Tal como se utiliza aquí, una "muestra de control" se refiere a una muestra de un sujeto de control o una muestra representativa de una población de sujetos de control.

Tal como se utiliza aquí, un "sujeto de control positivo" se refiere, dependiendo del contexto, a un sujeto que está padeciendo una enfermedad inducida por poliomavirus o a un sujeto que está padeciendo una infección activa por poliomavirus.

5 Tal como se utiliza aquí, una "muestra de control positiva" se refiere a una muestra de un sujeto de control positivo o una muestra representativa de una población de sujetos de control positivos.

10 "Mayor riesgo de desarrollar enfermedad asociada al poliomavirus" se usa aquí para referirse a un aumento en la probabilidad o posibilidad de desarrollar una enfermedad asociada a un poliomavirus. Como ejemplos de enfermedades asociadas al poliomavirus, se incluyen, aunque sin limitación, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), tumores tales como meduloblastoma, cáncer de colon, nefritis, nefropatía y cáncer de próstata. Se puede valorar este riesgo en relación al propio riesgo de un paciente, o con respecto a una población de referencia que no tiene evidencia clínica de la enfermedad o a una población de referencia que sí tiene evidencia clínica de la enfermedad. La población de referencia puede ser representativa del paciente con respecto a la edad aproximada, al grupo de edad, a las afecciones médicas y/o al sexo.

15 Tal como se utiliza aquí, una "infección activa por poliomavirus" se refiere a la replicación de un poliomavirus en una célula. "Replicación de poliomavirus" se refiere a cualesquiera una o más de transcripción de la región codificante tardía del genoma de poliomavirus, traducción de los ARN de la región codificante tardía, producción de viriones y liberación de viriones. "Reactivación de un poliomavirus" se refiere al desarrollo de una infección activa por poliomavirus en un sujeto que tiene una infección latente por poliomavirus.

20 Tal como se utiliza aquí, una "infección latente por poliomavirus" se refiere a una infección por poliomavirus que no está activa. Un sujeto que tiene o que se sospecha que tiene una infección latente por poliomavirus incluye a un sujeto que ha estado expuesto a un poliomavirus y/o en el que se ha detectado clínicamente la presencia de ADN de poliomavirus y/o anticuerpos antipoliomavirus.

25 Tal como se utilizan aquí, "agnoproteína" y "agnoproteína de poliomavirus" se refieren a una pequeña proteína codificada en la región codificante tardía de algunos poliomavirus, tales como el virus JC, el virus BK y SV40. La agnoproteína no está presente en la partícula viriónica. Se conocen en la técnica numerosas secuencias de agnoproteína y se mencionan ejemplos de secuencias en alguna otra parte del presente documento por el número de acceso. Se discuten las agnoproteínas de los poliomavirus, en general, por ejemplo, en Khalili *et al.*, J Cellular Physiol 204:1-7, 2005.

Descripción detallada de la invención

30 La agnoproteína es una pequeña proteína reguladora vírica expresada por la región codificante tardía de ciertos poliomavirus, tales como el virus JC. La agnoproteína no se incorpora a los viriones (partículas víricas). Por lo tanto, sólo se puede detectar la agnoproteína en células que replican activamente el virus. La agnoproteína es una proteína integral de la membrana y se localiza intracelularmente en la región perinuclear y en el citoplasma en células que replican el virus. La detección de agnoproteína ha requerido muestras de tejidos, tales como muestras de biopsias de tejidos o componentes relacionados, tales como lisados celulares o fracciones subcelulares. Inesperadamente, hemos descubierto que la agnoproteína se segrega por células infectadas con poliomavirus que sufren infección activa, y puede, por lo tanto, servir como marcador para la detección de la reactivación y replicación de poliomavirus en pacientes, por ejemplo en pacientes con riesgo de desarrollar enfermedades por infección con poliomavirus, en particular LMP. La hasta ahora no reconocida secreción de agnoproteína por células activamente infectadas con poliomavirus ha conducido al otro descubrimiento de que se puede detectar agnoproteína en los fluidos corporales de los pacientes. Por ejemplo, hemos descubierto que se libera agnoproteína de células infectadas con poliomavirus, en particular JCV, ya que se puede detectar agnoproteína en muestras biológicas, p. ej., suero y orina. Este descubrimiento permite ventajosamente el uso de muestras biológicas de fluidos corporales, en lugar de muestras de biopsias de tejidos u otros extractos de tejidos, en ensayos que detectan agnoproteína para la detección de la reactivación y replicación de poliomavirus. Los ensayos que utilizan una muestra de fluido corporal en comparación con una biopsia tisular no son tan invasivos, y, por lo tanto, minimizan los posibles efectos colaterales adversos. Otros beneficios incluyen un reducido coste y posiblemente resultados más rápidos, y menos trauma para el paciente. Como tales, se pueden emplear fácilmente ensayos que utilizan muestras de fluidos corporales como métodos de cribado rutinarios para pacientes con riesgo, por ejemplo, de desarrollar una enfermedad asociada al poliomavirus. Por lo tanto, la invención también proporciona ensayos para valorar el riesgo de desarrollar una enfermedad asociada al poliomavirus, tal como LMP, así como para monitorizar el estado del paciente a lo largo del tiempo, por ejemplo, durante un régimen de tratamiento terapéutico inmunosupresor. Por lo tanto, los métodos de la invención son útiles para valorar el riesgo de desarrollar LMP.

55 Los ensayos aquí descritos pueden incluir la detección de agnoproteína en una muestra biológica. Además, aunque la agnoproteína no forma parte de los viriones de poliomavirus, se espera que la secreción de agnoproteína a los fluidos corporales durante la infección activa por poliomavirus dé como resultado el desarrollo de anticuerpos contra agnoproteína en un paciente que tiene una infección activa por poliomavirus. Por lo tanto, también se describen ensayos que incluyen la detección de anticuerpos para agnoproteína en una muestra biológica.

Las muestras biológicas útiles en la práctica de los métodos de la invención son muestras de fluidos corporales. Como ejemplos de muestras de fluidos corporales, se incluyen sangre, tal como sangre periférica; un componente de la sangre, tal como suero sanguíneo ("suero") o plasma sanguíneo ("plasma"); orina; líquido raquídeo, tal como líquido cefalorraquídeo ("LCR"); semen, y linfa. Tal como se utiliza aquí, "fluido corporal" excluye muestras de biopsias tisulares, tales como muestras de tejidos fijados, y muestras de fluidos obtenidas de tejidos tales como lisados celulares y lisados de fracciones subcelulares. En aspectos preferidos, el fluido biológico es uno de plasma, suero, orina y LCR. En un aspecto, la muestra biológica es una de plasma, suero y orina. En un aspecto, la muestra biológica es una de plasma y suero. Se obtiene el fluido biológico del sujeto usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, un experto en la técnica sabe cómo extraer sangre y cómo procesarla para obtener suero y/o plasma para uso en el método. En algunos aspectos, el método de obtención del fluido biológico preferiblemente mantiene la integridad de las proteínas de la muestra, de tal forma que la agnoproteína, si está presente, puede ser cuantificada con precisión en el fluido biológico.

Se puede seleccionar una muestra biológica del grupo consistente en sangre, tal como sangre periférica; un componente de la sangre, tal como suero sanguíneo ("suero") o plasma sanguíneo ("plasma"); orina; líquido raquídeo, tal como líquido cefalorraquídeo ("LCR"); semen, y linfa. En los métodos de la invención, se selecciona la muestra biológica del grupo consistente en sangre, suero sanguíneo, orina y líquido cefalorraquídeo.

Los métodos de la invención pueden ser llevados a cabo con cualquier sujeto. El sujeto es preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un primate y más preferiblemente aún un humano. En algunas realizaciones, el sujeto tiene o se sospecha que tiene una infección latente por poliomavirus. En una realización, se emplea el método para determinar si la infección latente ha progresado para convertirse en una infección activa. En algunas realizaciones, se ha diagnosticado al paciente de una infección activa por poliomavirus por otros medios, y se usa el método de la invención para confirmar un diagnóstico de infección activa por poliomavirus.

En otras realizaciones, los métodos son llevados a cabo con un sujeto que presenta riesgo de desarrollar una enfermedad asociada a un poliomavirus. Como pacientes con riesgo de desarrollar una enfermedad asociada a un poliomavirus, se incluyen individuos a los que se ha diagnosticado una infección activa por poliomavirus, individuos a los que se ha diagnosticado una infección activa por poliomavirus y que están inmunocomprometidos e individuos que están inmunocomprometidos y que tienen o se sospecha que tienen una infección latente por poliomavirus. Como individuos inmunocomprometidos, se incluyen: pacientes de SIDA; pacientes con regímenes de tratamiento inmunosupresor crónicos, tales como pacientes de trasplante de órganos; pacientes con cáncer, tal como enfermedad de Hodgkin o linfoma; y pacientes con afecciones autoinmunes que están siendo tratados con micofenolato mofetilo o un agente biológico, tal como natalizumab, rituximab o efalizumab. Dichas afecciones autoinmunes incluyen, aunque sin limitación, esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide (AR) y lupus eritematoso sistémico (LES). Los pacientes ancianos con sistemas inmunitarios debilitados que tienen o se sospecha que tienen una infección latente por poliomavirus también se hallan en riesgo de desarrollar una enfermedad asociada a un poliomavirus.

Los poliomavirus son virus de ADN de doble hélice no envueltos. El ADN comprende una región codificante temprana y una región codificante tardía. La región temprana codifica dos oncoproteínas denominadas antígeno T grande (T-Ag) y antígeno t pequeño (t-Ag). La región tardía codifica tres proteínas de la cápside, VP1, VP2 y VP3. En algunos poliomavirus, la región tardía también codifica una pequeña proteína reguladora denominada agnoproteína. Son ejemplos de poliomavirus humanos que no codifican agnoproteína: virus KI (KIV), virus WU (WUV), virus de las células de Merkel (MCV o MCPyV), poliomavirus linfotrópico de células B (LPV), TSV, HPyV6, HPyV7 y HPyV9.

Los métodos de la invención comprenden la detección de una agnoproteína de poliomavirus JC o BK. Los poliomavirus actualmente conocidos en la técnica pueden infectar a aves y mamíferos. Como ejemplos de poliomavirus codificantes de agnoproteína, se incluyen, aunque sin limitación, virus JC (JCV); virus BK (BKV); virus del simio 40 (SV40) (que también se encuentra en humanos); poliomavirus bovino (BPV); virus del simio 12 (SV12); poliomavirus del mono ardilla (SquiPyV); poliomavirus de babuinos 1 (anteriormente agente del simio 12; SA12); y poliomavirus del chimpancé (ChPyV). JCV y BKV son ejemplos de poliomavirus codificantes de agnoproteína humanos. En una realización de la invención, se practica el método con agnoproteína de JCV. En otra realización, se practica el método con una agnoproteína de BKV. En aún otra realización, se practica el método con una combinación de una agnoproteína de JCV y una agnoproteína de BKV.

Se han asociado una serie de enfermedades a los poliomavirus. En humanos, se han asociado la leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), tumores neurales tales como meduloblastoma, oligodendroglioma, astroglioma y glioblastoma y el cáncer colorrectal al virus JC. Se ha detectado LMP en pacientes en situación de riesgo, incluyendo: pacientes de SIDA; pacientes con regímenes de tratamiento inmunosupresor crónicos, tales como pacientes de trasplante de órganos; pacientes con cáncer, tal como enfermedad de Hodgkin o linfoma; y pacientes con afecciones autoinmunes que están siendo tratados con micofenolato mofetilo o un agente biológico, tal como natalizumab, rituximab o efalizumab. Se ha asociado el virus BK a nefritis y/o nefropatía en pacientes que han sufrido un trasplante renal. También se ha asociado el virus BK a cáncer de próstata. Estas enfermedades asociadas a poliomavirus son una parte significativa de la pérdida de injertos. También se ha asociado el virus BK a cistitis, tal como cistitis hemorrágica y no hemorrágica, en pacientes que han sufrido un trasplante de médula ósea o de células madre.

Reactivación de poliomavirus

También se describe aquí un método para la detección de la reactivación de poliomavirus en una muestra biológica de un paciente que tiene o se sospecha que tiene una infección latente por poliomavirus. El método comprende la determinación de la presencia o ausencia de una agnoproteína de poliomavirus y/o de anticuerpos contra la agnoproteína en la muestra biológica. La presencia de la agnoproteína de poliomavirus y/o de anticuerpos contra la agnoproteína es indicativa de reactivación de poliomavirus en el paciente. El método puede comprender además la medición del nivel de la agnoproteína de poliomavirus o de los anticuerpos contra la agnoproteína en la muestra biológica. Se compara entonces ese nivel con el nivel de la agnoproteína de poliomavirus o de los anticuerpos contra la agnoproteína, respectivamente, en una muestra de control. Un nivel elevado de la agnoproteína de poliomavirus o de los anticuerpos contra la agnoproteína en la muestra biológica en relación, respectivamente, al nivel de agnoproteína de poliomavirus o de los anticuerpos contra la agnoproteína en la muestra de control es indicativo de reactivación de poliomavirus en el paciente. La muestra de control puede ser una muestra obtenida de un solo sujeto de control que no tiene reactivación de poliomavirus, o puede ser una muestra representativa de una población de dichos sujetos de control. Una muestra de control puede ser también una base de datos de referencia de los niveles para esa agnoproteína o para los anticuerpos contra esa agnoproteína en una población de sujetos de control que no tienen reactivación de poliomavirus. Se puede generar la base de datos de referencia midiendo la misma agnoproteína o los mismos anticuerpos contra la agnoproteína en las mismas condiciones en una población representativa.

También se describe aquí un método para la detección de la reactivación de poliomavirus; se compara el nivel de la agnoproteína de poliomavirus o de los anticuerpos contra la agnoproteína en la muestra biológica con el nivel de agnoproteína de poliomavirus o de anticuerpos contra la agnoproteína, respectivamente, en una muestra de control positivo. La muestra de control positivo puede ser una muestra obtenida de un solo sujeto de control positivo que tiene reactivación de poliomavirus, o puede ser una muestra representativa de una población de dichos sujetos de control positivos. Una muestra de control positivo puede ser también una base de datos de referencia de niveles para la agnoproteína de interés o para anticuerpos contra la agnoproteína de interés en una población de sujetos de control positivos que tienen reactivación de poliomavirus.

Infección activa por poliomavirus

La invención también proporciona un método para diagnosticar una infección activa por poliomavirus en un paciente. El método comprende la determinación de la presencia o ausencia de una agnoproteína de poliomavirus en una muestra biológica que comprende sangre, suero sanguíneo, líquido cefalorraquídeo u orina del paciente. La presencia de la agnoproteína de poliomavirus en sangre, suero sanguíneo o líquido cefalorraquídeo es indicativa de una infección activa por el virus JC en el paciente, y la presencia de agnoproteína de poliomavirus en una muestra biológica que comprende orina es indicativa de una infección activa por el virus BK en el paciente.

En una realización, el método comprende además la medición del nivel de la agnoproteína de poliomavirus en la muestra biológica. Se compara entonces ese nivel con el nivel de la agnoproteína de poliomavirus en una muestra de control. Un nivel elevado de la agnoproteína de poliomavirus en la muestra biológica en relación al nivel de agnoproteína de poliomavirus en la muestra de control es indicativo de una infección activa por el virus JC o el virus BK en el paciente. La muestra de control puede ser una muestra obtenida de un solo sujeto de control que no tiene una infección activa por poliomavirus o puede ser una muestra representativa de una población de dichos sujetos de control. Una muestra de control puede ser también una base de datos de referencia de niveles para la agnoproteína de interés en una población de sujetos de control que no tienen una infección activa por poliomavirus. Se puede generar la base de datos de referencia midiendo la misma agnoproteína en las mismas condiciones en una población representativa.

En otra realización del método para diagnosticar una infección activa por poliomavirus en un paciente, se compara el nivel de la agnoproteína de poliomavirus en la muestra biológica con el nivel de agnoproteína de poliomavirus en una muestra de control positiva. La muestra de control positiva puede ser una muestra obtenida de un solo sujeto de control positivo que tiene una infección activa por poliomavirus, o puede ser una muestra representativa de una población de dichos sujetos de control positivos. Una muestra de control positiva puede ser también una base de datos de referencia de niveles para la agnoproteína de interés en una población de sujetos de control positivos que tienen una infección activa por poliomavirus.

El establecimiento de un umbral para distinguir entre dos posibilidades, tales como un nivel normal en una muestra biológica y un mayor nivel en una muestra biológica, es bien conocido para el experto en la técnica. Se usa comúnmente un análisis de curva característica operativa del receptor ("ROC") en este sentido. Véanse, por ejemplo, Fawcett (2006) *Pattern Recognition Letters* 27:861-874; Pasanen *et al.* (1993, *Br J Cancer*. 67(4): 852-855), y Greiner *et al.* (2000) *Prev Vet Med*. 30:23-41. El establecimiento de un umbral es convencional en el desarrollo de ensayos diagnósticos. Por ejemplo, como sabe el experto en la técnica, la precisión de una prueba diagnóstica es comúnmente medida por su sensibilidad y especificidad. El experto en la técnica es bien consciente de que las distribuciones de datos procedentes de personas sanas y enfermas casi siempre se solapan (véase, por ejemplo, la página 6 de Sacher *et al.*, *Widmann's Clinical Interpretation of Laboratory Tests*, "Principles of Interpretation of Laboratory Tests", 11ª edición, F.A. Davis Company, Philadelphia, PA, 2000, pp. 3-27). Tal como se discute en Sacher *et al.*, la región de solapamiento conlleva "falsos positivos" en el grupo sano y "falsos negativos" en el grupo enfermo. La sensibilidad y

la especificidad, que se calculan en base a un valor umbral que separa valores identificados como "sanos" y valores identificados como "enfermos" (Ibid, pp. 5-6, Figura 1-1 y texto), describen la frecuencia de dichos falsos negativos y falsos positivos, respectivamente, para un conjunto de datos diagnósticos. Aunque la prueba diagnóstica ideal tendría tanto especificidad como sensibilidad del 100%, es decir, una prueba sin falsos positivos y sin falsos negativos, generalmente no se puede conseguir este alto estándar (Ibid, p. 6, párrafo final). Es decir, la prueba típica de diagnóstico es para un diagnóstico probable, no para un diagnóstico definitivo. En algunas realizaciones, el nivel umbral es un valor umbral según se discute en Sacher *et al.* (ibid). En algunas realizaciones del presente documento, el umbral es un valor umbral seleccionado para una gran especificidad. En otras realizaciones, el nivel umbral es un valor umbral seleccionado para una gran sensibilidad.

Se contempla que la cantidad de agnoproteína en un fluido biológico es proporcional al alcance o grado de la infección, por ejemplo, el número de células activamente infectadas por poliomavirus y/o el índice de transcripción y traducción de poliomavirus. Por consiguiente, también se proporciona un método de monitorización de una infección por poliomavirus a lo largo del tiempo en un paciente al que se le ha diagnosticado una infección activa por poliomavirus. El método comprende la valoración del nivel de una agnoproteína de poliomavirus en una primera muestra biológica que comprende sangre, suero sanguíneo, líquido cefalorraquídeo u orina obtenida del paciente en un primer punto en el tiempo para obtener un nivel basal. El método comprende además la valoración del nivel de agnoproteína de poliomavirus en una segunda muestra biológica que comprende sangre, suero sanguíneo, líquido cefalorraquídeo u orina obtenida en un segundo punto en el tiempo del paciente para obtener un segundo nivel. Se compara el segundo nivel con el primer nivel para identificar si el nivel del biomarcador está cambiando. Si el segundo nivel en la muestra biológica que comprende sangre, suero sanguíneo o líquido cefalorraquídeo es mayor que el nivel basal, la infección por virus JC en el paciente ha progresado. Si el segundo nivel de agnoproteína de poliomavirus en una muestra biológica que comprende orina de un paciente infectado con virus BK es mayor que el nivel basal, la infección por virus BK en el paciente ha progresado. Los ensayos que detectan anticuerpos contra la agnoproteína eventualmente comprenden la determinación del tipo de anticuerpos detectados, tales como IgG o IgM.

25 Riesgo de enfermedad asociada a poliomavirus

Tal como se discute en algún otro lugar del presente documento, la reactivación de poliomavirus puede dar lugar al desarrollo de enfermedades tales como LMP. Por consiguiente, se describe aquí un método para valorar el riesgo de desarrollar una enfermedad asociada a un poliomavirus en un paciente en situación de riesgo. El método comprende la determinación de la presencia o ausencia de una agnoproteína de poliomavirus y/o de anticuerpos contra la agnoproteína en una muestra biológica del paciente en situación de riesgo. La presencia de la agnoproteína de poliomavirus y/o de anticuerpos contra la agnoproteína en la muestra biológica es indicativa de un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad asociada al poliomavirus.

También se describe un método de monitorización del riesgo de desarrollo de una enfermedad asociada a poliomavirus en un paciente en función del tiempo. El método comprende la valoración del nivel de agnoproteína de poliomavirus y/o de anticuerpos contra la agnoproteína en una primera muestra biológica obtenida del paciente en situación de riesgo en un primer punto de tiempo para establecer un nivel basal del biomarcador de agnoproteína. El método comprende además la valoración del nivel de la agnoproteína o de anticuerpos contra la agnoproteína en un segundo punto de tiempo en una muestra biológica obtenida del paciente en situación de riesgo en un segundo tiempo con objeto de identificar si el nivel del marcador respectivo está cambiando. Si el segundo nivel es mayor que el nivel basal, el paciente tiene un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad asociada al poliomavirus. La segunda etapa de valoración se realiza generalmente al menos un día después de la valoración basal. También se puede realizar múltiples días, semanas, meses o años después de la valoración basal. Además, se puede realizar la segunda etapa de valoración de manera iterativa a lo largo del tiempo para adquirir datos adicionales y monitorizar así el riesgo. En un ejemplo de este método, la enfermedad es LMP y la agnoproteína es una agnoproteína de JCV.

En algunas realizaciones de los métodos para valorar el riesgo de desarrollar una enfermedad asociada al poliomavirus, se selecciona al paciente en situación de riesgo entre un paciente de SIDA, un paciente que está bajo terapia de inmunosupresión y un paciente inmunocomprometido. En algunas realizaciones, poliomavirus es el virus JC y la enfermedad asociada al poliomavirus es al menos una de LMP y un tumor, tal como oligodendroglioma, astroglioma, glioblastoma y cáncer de colon. En algunas realizaciones, poliomavirus es el virus BK y la enfermedad asociada al poliomavirus es el cáncer de próstata. En algunas realizaciones, el paciente en situación de riesgo es seleccionado entre un paciente de trasplante renal o un paciente de trasplante de médula ósea o de células madre. En estas realizaciones, poliomavirus es el virus BK y la enfermedad asociada al poliomavirus es nefritis y/o nefropatía.

Los métodos de ensayo utilizados en la práctica de la invención pueden emplear una sustancia que comprende un agente de unión específico para agnoproteína. Se pueden preparar agentes de unión, usando métodos convencionales en la técnica, para unirse específicamente a cualquier agnoproteína de poliomavirus. Hay un enorme número de secuencias proteicas para agnoproteínas de poliomavirus conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede disponer fácilmente de secuencias proteicas de agnoproteínas ejemplares en bases de datos de secuencias públicas, tales como la base de datos de secuencias genéticas de la National Library of Medicine GenBank® (Benson *et al.*, 2008, Nucleic Acids Research, 36(Database issue):D25-30). Como ejemplos de secuencias de agnoproteínas de poliomavirus, se incluyen, aunque sin limitación, las siguientes: virus JC (JCV) - números de acceso GenBank AAB62686.1, AAB62681.1, AAA82098.1, AAF04092.1, AAK70231.1, AAF04090.1, AAG30854.1 y AAG37195.1; virus

BK (BKV) - números de acceso GenBank AAA46879.1, AAT47410.1, AAT47404.1, AEO89560.1 e YP_717936.1; virus del simio 40 (SV40) - número de acceso GenBank YP_003708378.1; poliomavirus bovino (BPyV) - número de acceso GenBank NP_040784.1; virus del simio 12 (SV12) - número de acceso GenBank YP_002635563.1; poliomavirus del mono ardilla (SquiPyV) - número de acceso GenBank CAO03079.1; poliomavirus de babuinos 1 (SA12) - número de acceso GenBank YP_406551.1; y poliomavirus del chimpancé (ChPyV) - número de acceso GenBank CBX23441.1.

Es bien sabido en la técnica que las proteínas pueden existir en una muestra biológica en una pluralidad de formas diferentes. Estas formas pueden resultar de cualquiera o ambas de modificaciones pre- y postraduccion. Como formas modificadas previamente a la traduccion, se incluyen variantes alélicas, variantes de ajuste y formas de edición de ARN. Como formas modificadas con posterioridad a la traduccion, se incluyen formas resultantes de la escision proteolítica (p. ej., escision de una secuencia de señal o fragmentos de una proteína parental), glicosilación, fosforilación, lipidación, oxidación, metilación, cisteinilación, sulfonación y acetilación.

Por lo tanto, además de la secuencia ejemplar de agnoproteína aquí identificada por el nombre o el número de acceso, la invención también contempla la detección en una muestra de fluido corporal de variantes naturales que son al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% idénticas a las secuencias de biomarcadores ejemplificadas. Se puede usar la detección de dichas variantes naturales en una muestra de fluido biológico de un sujeto en los métodos descritos y reivindicados.

Se puede realizar la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos usando un algoritmo matemático. Por ejemplo, un algoritmo matemático útil para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268), modificado como en Karlin y Altschul (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877). Este algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, *et al.* (1990, J. Mol. Biol. 215:403-410), y se puede acceder a él, por ejemplo, en el sitio web mundial del National Center for Biotechnology Information (NCBI), que tiene el localizador de recursos universal "http://blast(dot)ncbi(dot)nim(dot)nih(dot)gov/Blast(dot)cgi". Se pueden realizar las búsquedas de nucleótidos BLAST con el programa NBLAST (designado como "blastn" en el sitio web del NCBI), usando los siguientes parámetros: penalización por hueco = 5; penalización por extensión de hueco = 2; penalización por desapareamiento = 3; recompensa por apareamiento = 1; valor de esperanza 10,0; y tamaño de palabra = 11 para obtener secuencias nucleotídicas homólogas a un ácido nucleico aquí descrito. Se pueden realizar las búsquedas de proteínas BLAST con el programa XBLAST (designado como "blastn" en el sitio web del NCBI) o el programa "blastp" del NCBI, usando los siguientes parámetros: valor de esperanza 10,0, matriz de puntuación BLOSUM62 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína aquí descrita. Para obtener alineaciones con huecos con fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.* (1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402). De manera alternativa, se puede usar PSI-Blast o PHI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecte relaciones distantes entre moléculas (Id.) y relaciones entre moléculas que comparten un patrón común. Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST, PSI-Blast y PHI-Blast, se pueden usar los parámetros de defecto de los respectivos programas (p. ej., XBLAST y NBLAT).

En los métodos de la invención, se estudia una muestra biológica en cuanto a la presencia de una agnoproteína de poliomavirus. Los métodos de ensayo pueden utilizar una sustancia que comprende un agente de unión específico para agnoproteína. En una realización, la sustancia comprende una colección de agentes de unión específicos para dos o más agnoproteínas diferentes. Las diferentes agnoproteínas pueden ser diferentes variantes del mismo tipo de poliomavirus, tales como variantes de agnoproteína de JCV, y/o pueden ser agnoproteínas de diferentes tipos de poliomavirus, tales como JCV y BKV.

También se describen aquí métodos que pueden ser realizados mediante la detección de anticuerpos contra la agnoproteína en una muestra biológica. Se puede realizar la detección de anticuerpos contra la agnoproteína en la muestra biológica usando métodos convencionales en la técnica. Como ejemplos de dichos métodos, se incluyen, aunque sin limitación, ELISA, aglutinación, precipitación, fijación del complemento y anticuerpos fluorescentes. En algunos ejemplos, la detección de anticuerpos contra la agnoproteína puede comprender la combinación del fluido biológico con una composición que comprende agnoproteína de poliomavirus y/o un fragmento antigénico de la misma en condiciones adecuadas para que los anticuerpos que hay en el fluido biológico se unan a la agnoproteína y/o a sus fragmentos antigénicos para formar un complejo anticuerpo-antígeno, y la detección después del complejo anticuerpo-antígeno. En algunos ejemplos, se pueden detectar los anticuerpos contra la agnoproteína usando un ensayo de aglutinación.

Como ensayos basados en la interacción de biomoléculas específicos de proteínas, se incluyen, aunque sin limitación, ensayos basados en anticuerpos, ensayos basados en aptámeros, ensayos de receptor y ligando, ensayos de actividad enzimática y ensayos de unión de reguladores alostéricos. La invención no se limita a ninguno de los métodos de detección de proteínas, sino que más bien incluye todos los métodos actualmente conocidos o desconocidos hasta la fecha, tales como los métodos descubiertos en la técnica. Se pueden detectar proteínas por otros métodos, p. ej., análisis de espectroscopia de masas, que no se basan en un resto de unión.

En una realización, el resto de unión comprende un anticuerpo que se une específicamente a agnoproteína. Se pueden usar anticuerpos en diversos métodos de determinación de proteínas basados en inmunoensayos, tales como análisis por transferencia de Western, inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunofluorescente, ensayo

quimioluminiscente, citometría de flujo, inmunocitoquímica y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

5 En un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), se puede unir una enzima, tal como, aunque sin limitación, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa o ureasa, por ejemplo, a un anticuerpo contra un antígeno o a un anticuerpo secundario para uso en un método de la invención. Se puede usar un sistema de detección de peroxidasa de rábano picante, por ejemplo, con el sustrato cromogénico tetrametilbencidina (TMB), que da un producto soluble en presencia de peróxido de hidrógeno que es detectable a 450 nm. Otros sistemas convenientes ligados a enzimas incluyen, por ejemplo, el sistema de detección de fosfatasa alcalina, que se puede usar con el sustrato cromogénico fosfato de *p*-nitrofenilo para dar un producto soluble fácilmente detectable a 405 nm. De forma similar, se puede usar un sistema de detección de beta-galactosidasa con el sustrato cromogénico *o*-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido (ONPG) para obtener un producto soluble detectable a 410 nm. De manera alternativa, se puede usar un sistema de detección de ureasa con un sustrato tal como urea-púrpura de bromocresol (Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO). Se pueden obtener anticuerpos primarios y secundarios ligados a enzimas útiles de cualquier serie de fuentes comerciales.

15 Para los ensayos de quimioluminiscencia y fluorescencia, se pueden obtener anticuerpos secundarios quimioluminiscentes y fluorescentes de cualquier serie de fuentes comerciales. La detección fluorescente es también útil para detectar antígeno o para determinar un nivel de antígeno en un método de la invención. Como fluorocromos útiles, se incluyen, aunque sin limitación, DAPI, fluoresceína, Hoechst 33258, R-ficoeritrina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo Texas y anticuerpos específicos de antígenos marcados con lissamina, fluoresceína o rodamina.

20 Se describen radioinmunoensayos (RIA), por ejemplo, en Brophy *et al.*, 1990, Biochem. Biophys. Res. Comm. 167:898-903, y Guechot *et al.*, 1996, Clin. Chem. 42:558-563. Se realizan los radioinmunoensayos, por ejemplo, usando anticuerpo primario o secundario marcado con yodo 125.

También se puede usar transferencia de Western para detectar y/o determinar el nivel de Cdc27 fosforilado. Se pueden cuantificar las transferencias de Western usando métodos bien conocidos, tales como la densitometría de barrido (Parra *et al.*, 1998, J. Vasc. Surg. 28:669-675).

25 Se analiza una señal emitida por un anticuerpo detectable, por ejemplo, usando un espectrofotómetro para detectar color procedente de un sustrato cromogénico; un contador de radiación para detectar radiación, tal como un contador gamma para la detección de yodo 125; o un fluorómetro para detectar fluorescencia en presencia de luz de una determinada longitud de onda. Cuando se usa un ensayo ligado a enzimas, se realiza un análisis cuantitativo de la cantidad de antígeno usando un espectrofotómetro. Se entiende que los ensayos de la invención pueden llevarse a cabo manualmente o, si se desea, pueden estar automatizados, y que se puede detectar la señal emitida por múltiples muestras simultáneamente en muchos sistemas comerciales. También se puede detectar la unión antígeno-anticuerpo, por ejemplo, por espectrometría de masas.

35 El anticuerpo usado para detectar agnoproteína en una muestra en un inmunoensayo puede comprender un anticuerpo policlonal o monoclonal. El anticuerpo puede comprender un anticuerpo intacto o fragmentos de anticuerpo capaces de unirse específicamente a antígeno. Dichos fragmentos incluyen, aunque sin limitación, fragmentos Fab y F(ab')₂.

40 Las técnicas para detectar y cuantificar (tal como con respecto a un control) la unión de anticuerpos son bien conocidas en este campo. Se puede detectar la unión de anticuerpos a agnoproteína a través del uso de reactivos químicos que generan una señal detectable que corresponde al nivel de unión de anticuerpos y, por consiguiente, al nivel de expresión de proteína marcadora. Como ejemplos de dichas sustancias detectables, se incluyen enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Como ejemplos de enzimas adecuadas, se incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa o acetilcolinesterasa; como ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados, se incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; como ejemplos de materiales fluorescentes adecuados, se incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilaminofluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; como ejemplos de materiales bioluminiscentes, se incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y como ejemplos de materiales radiactivos adecuados, se incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S o ³H.

50 Se puede detectar la unión de anticuerpos a través del uso de un anticuerpo secundario que se conjuga a un marcaje detectable. Como ejemplos de marcajes detectables, se incluyen, aunque sin limitación, conjugados de polímero-enzima. Las enzimas en estos complejos se usan típicamente para catalizar la deposición de un cromógeno en el sitio de unión antígeno-anticuerpo, para dar así como resultado una tinción celular que se corresponde con el nivel de expresión del biomarcador de interés. Como enzimas preferidas de particular interés, se incluyen peroxidasa de rábano picante (HRP) y fosfatasa alcalina (AP).

55 Se puede detectar y cuantificar agnoproteína mediante ensayos basados en aptámeros, que son muy similares a los ensayos basados en anticuerpos, pero con el uso de un aptámero en lugar de un anticuerpo. Un ensayo "basado en aptámeros" es, por lo tanto, un ensayo para la determinación de polipéptido que se basa en la unión específica de un aptámero. Un aptámero puede ser cualquier polinucleótido, generalmente un ARN o un ADN, que tenga una actividad

biológica útil en términos de actividad bioquímica o atributos de reconocimiento molecular. Normalmente, un aptámero tiene una actividad molecular tal como una actividad enzimática o unión a un polipéptido en una región específica (es decir, similar a un epítipo para un anticuerpo) del polipéptido. Es generalmente sabido en la técnica que se puede producir un aptámero por métodos de selección *in vitro*. Como métodos de selección *in vitro*, se incluye un método bien conocido denominado evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (también conocido como SELEX). Brevemente, la selección *in vitro* conlleva el cribado de una reserva de polinucleótidos aleatorios para un polinucleótido particular que se une a una biomolécula, tal como un polipéptido, o que tiene una actividad particular que es seleccionable. En general, el polinucleótido particular representa una fracción muy pequeña de la reserva; por lo tanto, se emplea una ronda de amplificación, normalmente por reacción en cadena de polimerasa, para aumentar la representación de aptámeros potencialmente útiles. Se emplean sucesivas rondas de selección y amplificación para aumentar exponencialmente la abundancia de un aptámero particular. Se describe la selección *in vitro* en Famulok y Szostak, *Angew. Chem.*, 1992, 104, 1001. (*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1992, 31, 979-988.); Famulok y Szostak, *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol 7, F. Eckstein, D. M. J. Lilley, Eds., Springer Verlag, Berlín, 1993, pp. 271; Klug y Famulok, *Mol. Biol. Reports* 1994, 20, 97-107; y Burgstaller y Famulok, *Angew. Chem.* 1995, 107, 1303-1306 (*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995, 34, 1189-1192); Patente Estadounidense N° 6.287.765, Patente Estadounidense N° 6.180.348, Patente Estadounidense N° 6.001.570, Patente Estadounidense N° 5.861.588, Patente Estadounidense N° 5.567.588, Patente Estadounidense N° 5.475.096 y Patente Estadounidense N° 5.270.163.

Se puede preparar agnoproteína sustancialmente pura, que puede usarse como inmunógeno para producir anticuerpos policlonales o monoclonales, o como sustrato para seleccionar aptámeros, o para unir anticuerpos contra la agnoproteína presente en una muestra biológica, por ejemplo, por métodos de ADN recombinante. Por ejemplo, se puede clonar el ADNc de la proteína marcadora en un vector de expresión por técnicas que se encuentran dentro de los conocimientos en este campo. Se puede transfectar entonces un vector de expresión que comprende secuencias codificantes de la proteína marcadora en un huésped eucariótico apropiado, tras lo cual se expresa la proteína. Se puede aislar luego la proteína expresada por cualquier técnica adecuada. En algunas realizaciones, se pueden usar fragmentos antigénicos de agnoproteína. Los fragmentos antigénicos de una agnoproteína de poliomavirus pueden ser fácilmente identificados por el experto en la técnica usando métodos conocidos en este campo. La agnoproteína de poliomavirus es una proteína integral de la membrana de tipo II, por lo que la porción N-terminal de la proteína comprende el dominio intracelular. Como ejemplos de fragmentos de agnoproteína contemplados para ser fragmentos antigénicos, se incluyen un fragmento que comprende o consiste esencialmente en el dominio extracelular, un fragmento que comprende o consiste esencialmente en el dominio de transmembrana y un fragmento que comprende o consiste esencialmente en el dominio intracelular. Se pueden predecir los dominios por programas conocidos en la técnica para predecir dominios de transmembrana.

Se puede detectar agnoproteína por cualquiera de los métodos bien conocidos de espectrometría de masas.

En algunas realizaciones de los métodos de la invención, el método comprende además el estudio de una primera composición de control que no contiene agnoproteína y una segunda composición de control que sí contiene agnoproteína. Dichos ensayos y otras etapas realizadas para verificar, por ejemplo, la integridad de la sustancia utilizada para detectar agnoproteína, así como la integridad de la muestra biológica, son convencionales en la técnica.

Los métodos para detectar agnoproteína o anticuerpos contra la agnoproteína pueden adaptarse fácilmente a la forma de kit. Un kit puede contener un conjunto de reactivos que detectan específicamente para la detección de agnoproteína o anticuerpos contra la agnoproteína y uno o más reactivos y/o diluyentes para facilitar el contacto del reactivo y la agnoproteína o los anticuerpos contra la agnoproteína en la muestra. El kit puede comprender además instrucciones para usar el kit. El reactivo puede comprender, por ejemplo, un anticuerpo o aptámero específico para agnoproteína, o puede comprender agnoproteína o fragmentos antigénicos de la misma. Se puede marcar la agnoproteína, el anticuerpo o el aptámero de manera detectable, como se ha descrito anteriormente. El kit puede comprender además componentes necesarios para detectar el marcaje detectable (p. ej., una enzima o un sustrato), e instrumentación para la detección y la medición.

El kit puede comprender, por ejemplo: (1) un primer anticuerpo (p. ej., unido a un soporte sólido) que se une a una proteína marcadora, y, eventualmente, (2) un segundo anticuerpo diferente que se une o bien a la proteína o bien al primer anticuerpo y se conjuga a un marcaje detectable.

El kit puede comprender además uno o más tampones y/o reactivos, p. ej., tampón y/o reactivos de marcaje, y medios de detección para detectar un marcaje detectable. También se pueden incluir en el kit protocolos para usar estos tampones y reactivos para la realización de diferentes etapas del procedimiento.

Se pueden suministrar los reactivos en forma sólida (p. ej., liofilizados) o líquida. Los kits pueden comprender eventualmente diferentes envases (p. ej., vial, ampolla, tubo de ensayo, matraz o botella) para cada tampón y/o reactivo individual. Cada componente será generalmente adecuado alicuotado en su respectivo envase o presentado en forma concentrada. También se pueden proporcionar otros recipientes adecuados para realizar determinadas etapas para los métodos descritos. En determinados ejemplos, los kits comprenden además muestras de control.

El material instructivo puede comprender una publicación, un registro, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que pueda ser usado para comunicar la utilidad del método. El prospecto del envase puede comprender texto

albergado en cualquier medio físico, p. ej., papel, cartón o película, o puede estar albergado en un medio electrónico, tal como un disquete, un chip, una tarjeta de memoria u otra forma de almacenamiento electrónico. El material instructivo del kit puede, por ejemplo, ir unido a un envase que contiene otros contenidos del kit, o ser enviado junto con un envase que contiene el kit. De manera alternativa, se puede enviar el material instructivo por separado del envase con la intención de que el receptor use de manera cooperativa el material instructivo y los contenidos del kit.

Se describe además la invención con detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Se facilitan estos ejemplos con fines meramente ilustrativos, y no pretenden ser limitantes a menos que se especifique lo contrario. Por lo tanto, la invención no debería en modo alguno ser considerada como limitada a los siguientes ejemplos, sino que más bien habría que considerar que incluye todas y cada una de las variaciones dentro del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1: Detección de agnoproteína en medio de crecimiento de células infectadas con JCV

Para determinar la secreción de agnoproteína de JCV por células infectadas, se infectaron primeramente células SVG-A con la cepa Mad-1 del virus JC, que fue aislada de un paciente con la enfermedad desmielinizante leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP). El ciclo inicial de la infección por JCV dura hasta 20 días, y la expresión de agnoproteína puede ser detectada tan pronto como 10 días postinfección. Las células SVG-A son un subclón de la estirpe celular glial humana SVG original establecida por transformación de células gliales fetales humanas mediante un mutante de SV40 defectuoso en origen (Major *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1257-1261, 1985). Se recogió el medio de crecimiento de las células 10 y 20 días postinfección (dpi). Se centrifugó el medio de crecimiento recogido a 5K durante 15 min. para eliminar los detritos celulares. Se recogió el sobrenadante y se desnaturizó a 95°C. En paralelo, se usaron extractos de células enteras como controles positivos. Para determinar la presencia de agnoproteína en el medio de crecimiento, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación usando un anticuerpo específico para agnoproteína. Tal como se muestra en la Fig. 1, la agnoproteína es expresada por las células infectadas (calle 1) y está presente en el medio de crecimiento (calle 4, 10 días postinfección: calle 5, 20 días postinfección), lo que indica que las células infectadas segregan agnoproteína. También se muestran en la Fig. 1 los resultados del ensayo de inmunoprecipitación para el suero normal de conejo (calle 3, IP-NRS) y los controles positivo (calle 1) y negativo (calle 2).

Ejemplo 2: Secreción de agnoproteína por células que expresan agnoproteína

El siguiente estudio demuestra que se puede detectar agnoproteína en forma soluble en el medio de crecimiento de células que replican activamente un poliomavirus, JCV, y que la aparición de agnoproteína en el medio de crecimiento no se debe simplemente a la destrucción mecánica de la membrana celular por las partículas víricas en la fase de liberación por las células.

Se infectaron células Tc620 de oligodendroglioma humano con adenovirus defectuoso en replicación codificante de agnoproteína de JCV. Se infectaron células de control con adenovirus no codificante de agnoproteína. Se recogió el medio de crecimiento a las 48 h posteriores a las transfecciones simultáneamente junto con extractos de células enteras. Se usaron 5 ml de medio de cultivo en las inmunoprecipitaciones. Se cargaron extractos de células enteras como controles positivo (calle 1) y negativo (calle 2) de la detección (Figura 2). Se expresó agnoproteína de manera transitoria en las células Tc620 en ausencia de ninguna infección vírica lítica. Se recogió el medio de crecimiento y se centrifugó a 5K durante 15 min., y se recogió el sobrenadante para el ensayo de inmunoprecipitación. Tal como se muestra en la Figura 2, la agnoproteína inmunoprecipitó del medio de crecimiento con un anticuerpo específico para agnoproteína (IP-Agno, calle 4), pero no con suero normal de conejo (IP-NRS, calle 3). Por lo tanto, se segrega agnoproteína por las células que expresan agnoproteína al espacio extracelular.

Ejemplo 3: Ensayo de detección basado en ELISA para agnoproteína

Para establecer un sistema de detección para agnoproteína, se expresó y purificó agnoproteína en *E. coli* fusionada a MBP (MBP-agno). Se utilizó la MBP-agno purificada para la estandarización de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección de agnoproteína usando un anticuerpo específico para agnoproteína (Figura 3A). Con objeto de cuantificar la cantidad de la agnoproteína, se estudió primeramente medio acondicionado de células que expresan agnoproteína. Se obtuvo medio acondicionado de células Tc620 nulas para adeno (cont.) o infectadas con adeno-agno (Ad-agno). Tal como se muestra en la Figura 3B, el medio acondicionado de células que expresan agnoproteína dio un ensayo positivo para la agnoproteína (~ 1 ng/μl), mientras que el medio acondicionado de las células de control no mostró reactividad, lo que indica que el ensayo basado en ELISA puede detectar y cuantificar específicamente agnoproteína.

Ejemplo 4: Detección de agnoproteína en muestras de pacientes de LMP y EM

Se obtuvo una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) de un caso de LMP desarrollado en un paciente con VIH-SIDA y se sometió a ELISA para agnoproteína. Se obtuvieron también muestras de suero de muestras de suero de dos pacientes de EM en diferentes estadios de la enfermedad que tomaban terapia con anticuerpos monoclonales natalizumab (Tysabri®) para la EM. El tratamiento con natalizumab en pacientes de EM es un factor de riesgo para la

- reactivación del virus JC y el desarrollo de LMP (Kappos *et al.*, *The Lancet Neurology*, 6(5):431-441, 2007). Tal como se muestra en la Figura 4A, se detectó agnoproteína en la muestra de LCR (HIV/PML-CSF), lo que indica que la agnoproteína sirve como marcador del desarrollo de LMP. Las muestras de suero de pacientes de EM fueron también positivas para agnoproteína en todos los tiempos de extracción del tratamiento que representaban diferentes estadios de enfermedad ((7A-D y 11A-D). La cantidad de la agnoproteína detectada variaba en diferentes fases del tratamiento. Se usó agnoproteína recombinante a concentraciones de 10, 1 y 0,1 picogramos como control positivo (SS=10 pg agno; SS=1 pg agno; SS=0,10 pg agno). Se usaron la muestra de suero de un individuo sano (SS) y PBS (Neg-PBS x 2) como controles negativos del experimento.

Ejemplo 5: Presencia de agnoproteína en muestras biológicas obtenidas de pacientes con nefropatía por BKV

- 10 Se realizó un ELISA para agnoproteína en muestras de plasma, suero y orina obtenidas de pacientes diagnosticados de nefropatía por BKV, según el procedimiento del Ejemplo 4. Cinco muestras de orina de 11 pacientes fueron positivas para agnoproteína (Figura 4B).

Las descripciones de todas y cada una de las patentes, solicitudes de patente y publicaciones aquí citadas son aquí incorporadas por el presente como referencia en su totalidad.

- 15 Aunque se ha descrito esta invención en relación a realizaciones específicas, es evidente que otros expertos en la técnica pueden contemplar otras realizaciones y variaciones de esta invención sin desviarse del alcance de la invención. Las reivindicaciones adjuntas pretenden ser consideradas como inclusivas de todas esas realizaciones y variaciones equivalentes.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para detectar una infección activa por poliomavirus en un paciente, comprendiendo el método:
determinar la presencia o ausencia de una agnoproteína de poliomavirus en una muestra biológica, que comprende sangre, suero sanguíneo, líquido cefalorraquídeo u orina, obtenida del paciente,
- 5 en donde la presencia de la agnoproteína de poliomavirus en una muestra biológica que comprende sangre, suero sanguíneo o líquido cefalorraquídeo es indicativa de una infección activa por el virus JC en el paciente, y la presencia de agnoproteína de poliomavirus en una muestra biológica que comprende orina es indicativa de una infección activa por el virus BK en el paciente.
2. El método según la reivindicación 1, en donde el paciente es un paciente que tiene o se sospecha que tiene una
10 infección latente por poliomavirus, en donde la presencia de la agnoproteína de poliomavirus en la muestra biológica es indicativa de reactivación del virus JC latente o del virus BK latente en el paciente.
3. El método de la reivindicación 1, que además comprende:
medir el nivel de la agnoproteína de poliomavirus en la muestra biológica, y
comparar el nivel de la agnoproteína de poliomavirus en la muestra biológica con el nivel de agnoproteína de
15 poliomavirus en una muestra de control,
en donde un elevado nivel de la agnoproteína de poliomavirus en la muestra biológica en relación con el nivel de agnoproteína de poliomavirus en la muestra de control es indicativo de una infección activa por el virus JC o el virus BK en el paciente.
4. Un método *in vitro* para monitorizar una infección por virus JC o virus BK en un paciente humano, comprendiendo
20 el método:
valorar el nivel de una agnoproteína de poliomavirus en una muestra biológica que comprende sangre, suero sanguíneo, líquido cefalorraquídeo u orina tomada como primera muestra biológica del paciente para obtener un nivel basal,
valorar el nivel de agnoproteína de poliomavirus en una segunda muestra biológica que comprende la sangre, el
25 suero sanguíneo, el líquido cefalorraquídeo o la orina del paciente para obtener un segundo nivel de agnoproteína de poliomavirus, en donde se obtiene la segunda muestra biológica del paciente en un segundo tiempo,
en donde, si el segundo nivel de agnoproteína de poliomavirus en una muestra biológica que comprende sangre, suero sanguíneo o líquido cefalorraquídeo de un paciente infectado con virus JC es mayor que el nivel basal, la infección por el virus JC en el paciente ha progresado, o
30 en donde, si el segundo nivel de agnoproteína de poliomavirus en una muestra biológica que comprende orina de un paciente infectado con virus BK es mayor que el nivel basal, la infección por el virus BK en el paciente ha progresado.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la infección vírica detectada es infección por el virus JC y la muestra biológica comprende suero sanguíneo o líquido cefalorraquídeo.
- 35 6. El método de la reivindicación 4, en donde la infección vírica monitorizada es infección por el virus JC y la muestra biológica comprende suero sanguíneo o líquido cefalorraquídeo.
7. Un método para valorar el riesgo de desarrollar una enfermedad asociada al virus JC o al virus BK en un paciente humano, que comprende:
determinar la presencia o ausencia de una agnoproteína de poliomavirus en una muestra biológica que comprende
40 sangre, suero sanguíneo o líquido cefalorraquídeo obtenida del paciente, o
determinar la presencia o ausencia de una agnoproteína de poliomavirus en una muestra biológica que comprende orina obtenida del paciente,
en donde la presencia de la agnoproteína de poliomavirus en la sangre, el suero sanguíneo o el líquido cefalorraquídeo es indicativa de un mayor riesgo de desarrollar uno o más de leucoencefalopatía multifocal
45 progresiva (LMP), meduloblastoma, oligodendroglioma, astroglioma, glioblastoma y cáncer de colon, y la presencia de la agnoproteína de poliomavirus en la muestra de orina es indicativa del desarrollo de uno o más de nefritis, nefropatía y cáncer de próstata.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el paciente se selecciona entre un paciente de SIDA, un paciente sometido a terapia inmunosupresora, un paciente inmunocomprometido y un paciente de trasplante renal.

Fig. 1

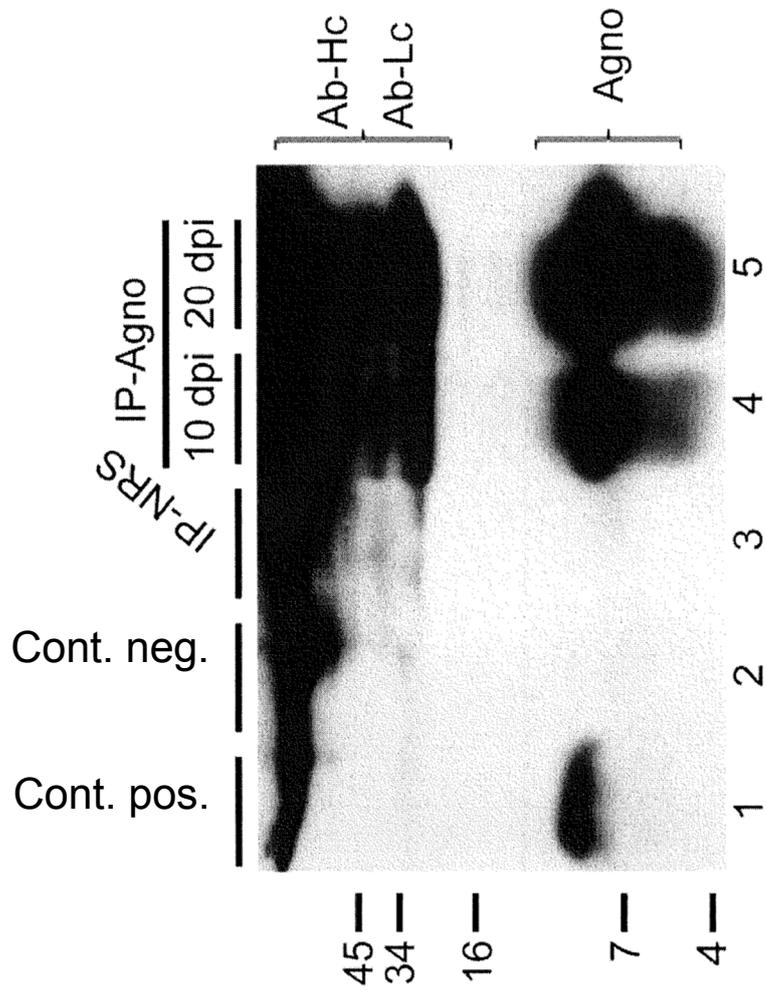


Fig. 2

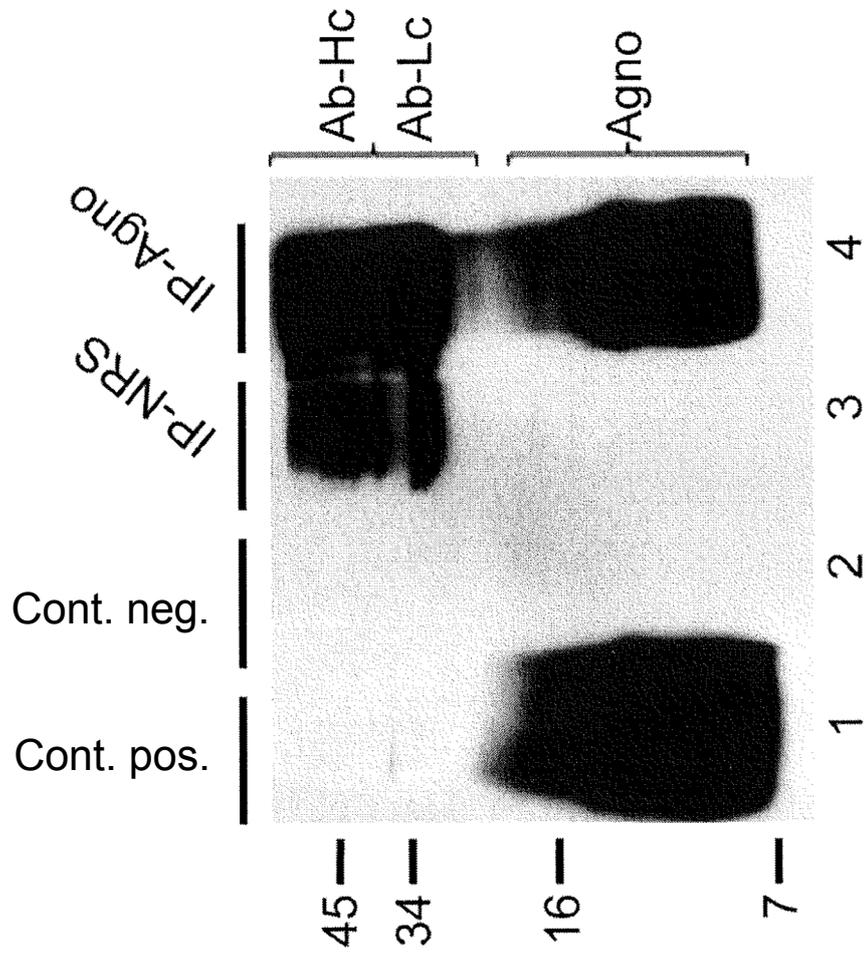


Fig. 3A

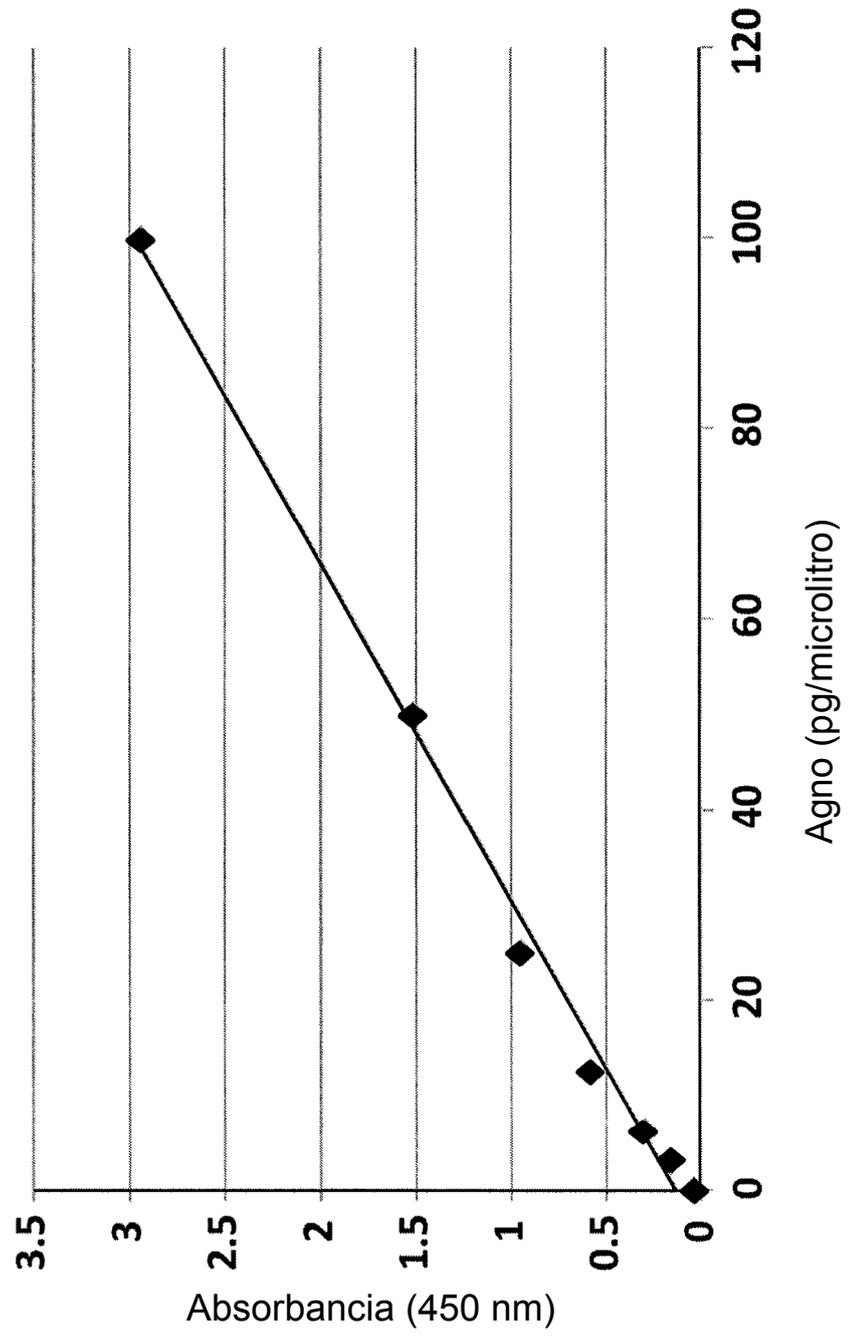


Fig. 3B

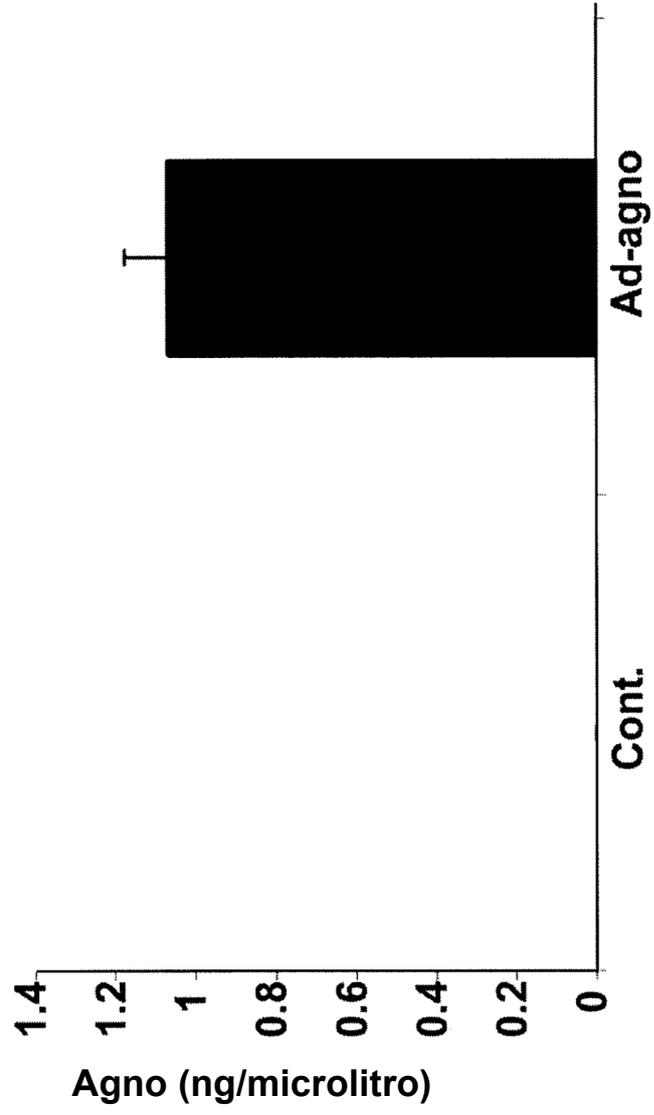


Fig. 4A

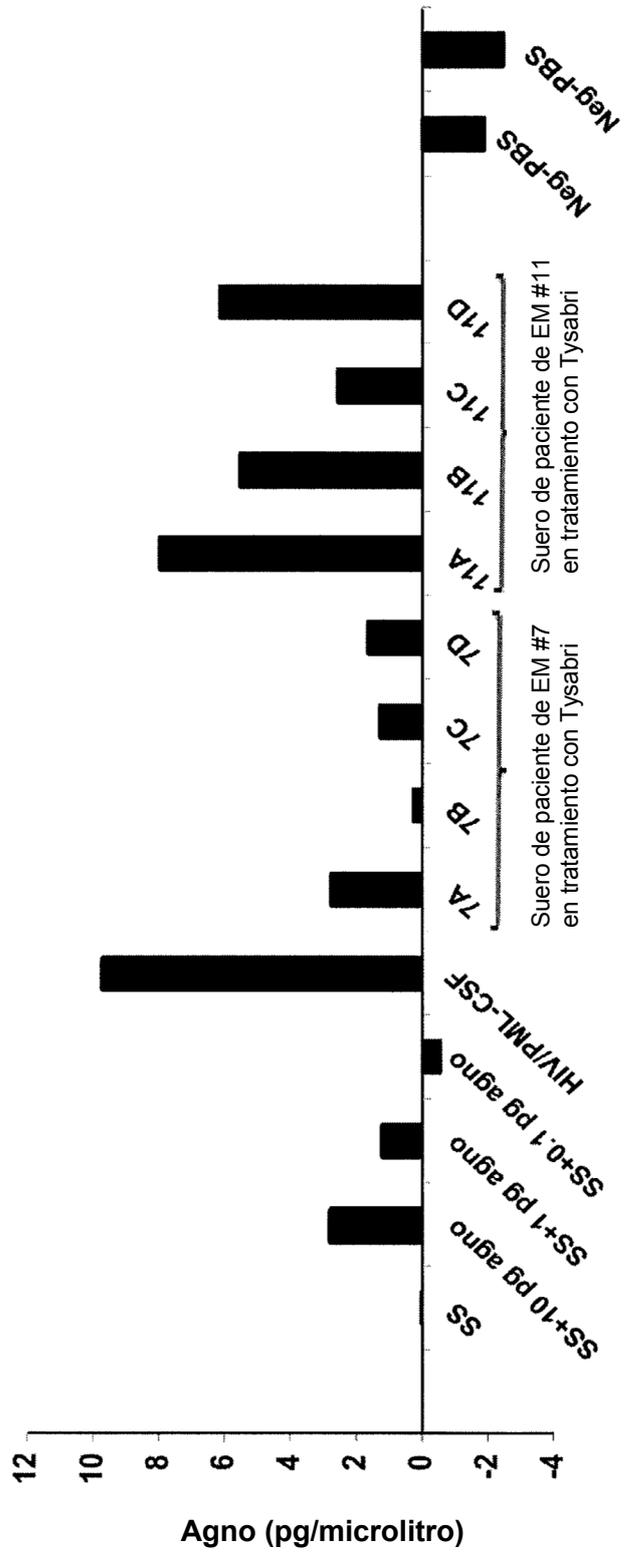


Fig. 4B

