

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 782**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.04.2013 PCT/EP2013/058231**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013 WO13156627**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2013 E 13717292 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2839040**

54 Título: **Cuantificación del genoma de anelovirus como biomarcador de la inmunosupresión**

30 Prioridad:

20.04.2012 EP 12305462

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

11.04.2019

73 Titular/es:

**ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT (20.0%)
7, avenue du Général de Gaulle
94700 Maisons-Alfort, FR;
INSTITUT PASTEUR (20.0%);
UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (20.0%);
ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS (20.0%) y
PATHOQUEST (20.0%)**

72 Inventor/es:

**ELOIT, MARC;
CHEVAL, JUSTINE;
HEBERT, CHARLES y
LECUIT, MARC**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 708 782 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

Cuantificación del genoma de anelovirus como biomarcador de la inmunosupresión.

5 La presente invención se refiere al uso de la medida de la carga adenovírica para la determinación de la inmunosupresión. Más específicamente, la invención se refiere a un método para el diagnóstico de la inmunosupresión en un sujeto basado en la carga viral de anelovirus.

10 El sistema inmunitario defiende a un organismo frente a agresiones tales como infección de patógenos, transformación celular, y daño físico o químico. Cuando el sistema inmunitario es menos activo que el normal, se produce la inmunodeficiencia o inmunosupresión, dando como resultado infecciones potencialmente mortales o cáncer. La inmunosupresión es una afección en la que la capacidad del sistema inmunitario para combatir enfermedades, por ejemplo enfermedades infecciosas o cáncer, está comprometida o totalmente ausente. La inmunosupresión adopta diversas formas, y puede afectar al sistema inmunitario innato o al adaptativo, o a ambos, dependiendo de la fuente de la deficiencia. Habitualmente da como resultado infecciones recurrentes o potencialmente mortales.

15 La inmunosupresión puede ser el resultado de enfermedades, o se puede producir mediante fármacos o por una infección, dando como resultado una mayor susceptibilidad a infecciones secundarias por patógenos tales como bacterias y virus.

20 Muchas enfermedades se caracterizan así por el desarrollo de inmunosupresión progresiva en el paciente. La presencia de una respuesta inmunitaria alterada en pacientes con neoplasias (por ejemplo leucemia, linfoma, mieloma múltiple) está bien documentada. También se ha observado inmunosupresión progresiva en ciertas infecciones crónicas tales como SIDA, septicemia, lepra, infecciones por citomegalovirus, malaria, lupus, y similares. La inmunodeficiencia es también un efecto adverso potencial de muchos tratamientos terapéuticos (por ejemplo radioterapia o quimioterapia). En tal situación de inmunosupresión no deliberada, los pacientes son tratados habitualmente con inmunoestimulantes (por ejemplo citocinas), a fin de estimular el sistema inmunitario del paciente. Sin embargo, los inmunoestimulantes carecen de especificidad, por cuanto activan el sistema inmunitario en general. Si no se administran con cautela, pueden disparar una sobreactivación del sistema inmunitario, dando como resultado una mala tolerancia.

25 Como alternativa, la inmunosupresión puede resultar de un intento deliberado de debilitar el sistema inmunitario. En general, la inmunosupresión inducida deliberadamente se lleva a cabo mediante administración de fármacos inmunosupresores, a fin de evitar que el cuerpo rechace un trasplante de órgano, o para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Los tratamientos inmunosupresores, sin embargo, cuando son inapropiados o inadecuados, pueden conducir a un estado de sobreinmunosupresión en el que el paciente es extremadamente vulnerable a infecciones. De hecho, las infecciones oportunistas y las neoplasias siguen siendo una causa significativa de muerte tras el trasplante, y son consecuencias obvias de la sobreinmunosupresión.

30 Debido a la gran diversidad de causas, y debido a que cada una de esas causas puede afectar al sistema inmunitario en un aspecto diferente, se han desarrollado diferentes diagnósticos para la inmunosupresión. Existen algunas medidas no específicas y específicas de patógenos de la función inmunitaria mediada por células (Fishman et al. N Engl J Med. 2007, Fishman et al. Liver Transpl. 2011). Los ensayos de la función inmunitaria mediada por células incluyen el análisis del subconjunto de linfocitos, particularmente el recuento de células T CD4⁺ o la medida de la relación de células T CD4⁺/CD8⁺, el ensayo de la función neutrofílica, el ensayo de la activación de NK, el ensayo de proliferación de linfocitos (Hutchinson et al. Nephrol Dial Transplant 2003).

35 Sin embargo, esos ensayos no son suficientemente sensibles para detectar ligeros cambios en el sistema inmunitario. Adicionalmente, cada uno de esos ensayos se centra en evaluar la integridad de la ruta o mecanismo específicos del sistema inmunitario. Ninguno de ellos se basa en la evaluación del resultado final, que es la capacidad del sistema inmunitario para responder a o controlar infecciones.

40 Actualmente no hay ningún método universal para el diagnóstico de la inmunosupresión que se pudiese usar universalmente, esto es, para cualquier causa sospechosa de inmunosupresión. De este modo, continúa existiendo la necesidad de un ensayo rápido, fiable y no invasivo que evalúe de forma precisa el estado inmunitario de un paciente. Especialmente, un método de diagnóstico que permitiese la evaluación de la capacidad del sistema inmunitario para responder a las infecciones se podría usar para ajustar de forma fina los tratamientos inmunosupresores a las necesidades apropiadas de los pacientes, y evitar la sobreinmunosupresión.

45 Moen, E.M. et al. J. Med. Virol. 70:177-182, 2003 enseñan una tendencia dirigida a incrementar la viremia de TTV y TLMV en pacientes que reciben inmunosupresión tras el trasplante de riñón. Los inventores han encontrado que la carga anelovírica es un marcador fiable del estado inmunitario, y de este modo se puede usar para el diagnóstico de la inmunosupresión.

Descripción detallada

Los anelovirus (ANV) son virus que infectan a más del 90% de los individuos. Son frecuentes las infecciones mixtas con varias cepas y especies de ANV, y la mayoría de los sujetos hospedan por lo menos una de ellas, pero no se ha atribuido ninguna consecuencia patológica a la infección por ANV. En particular, en la técnica anterior no se ha identificado ninguna correlación clara entre la carga anelovírica y el estado inmunitario del sujeto. Los pacientes en tratamiento inmunosupresor mostraron en general un incremento en la carga de cepas víricas específicas (por ejemplo TLMV y TTV). Sin embargo, las variaciones entre individuos fueron tales que la única información relevante solamente se pudo obtener examinando los cambios en la carga vírica de cada individuo. En particular, no se pudo sacar ninguna conclusión a partir de la comparación de los grupos de pacientes, tratados o no tratados. De este modo, los métodos de la técnica anterior no permitieron la determinación del estado inmunosupresivo de un sujeto y el diseño de un tratamiento específico del mismo (Moen et al., J Med Virol, 70(1): 177-182, 2003; Moen et al., AIDS, 16(12): 1679-1682, 2002; Christensen et al., J Infect Dis, 181: 1796-1799, 2000; Shibayama et al., AIDS, 15: 563-570, 2001; Touinssi et al., J Clin Virol, 21: 135-141, 2001).

Por el contrario, los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que la carga anelovírica se puede usar como un marcador para la inmunosupresión. Mientras que los estudios previos se basaron en la PCR, y de este modo eran muy dependientes del diseño de los cebadores, dando como resultado variantes perdidas de este virus enormemente variable (Moen et al., J Virol Methods, 104(1): 59-67, 2002), los presentes inventores usaron Secuenciación de Alto Rendimiento (HTS). Esta técnica condujo a la identificación de un intervalo amplio e imparcial de secuencias de ANV, permitiendo a los presentes inventores demostrar la existencia de una correlación entre la carga anelovírica y la inmunosupresión, con un grado elevado de confianza. En particular, los inventores han encontrado que los sujetos inmunosuprimidos tienen una mayor carga anelovírica en comparación con los sujetos sanos. La medida de la carga global de los virus de la familia de anelovirus se puede usar así como un marcador del estado inmunitario del sujeto. De forma más precisa, según la invención, una carga anelovírica elevada en un sujeto indica que dicho sujeto está inmunosuprimido.

De este modo, en un primer aspecto, la invención se refiere a un método para caracterizar el estado inmunosuprimido o no inmunosuprimido de un sujeto, que comprende las etapas siguientes:

- a) determinar la carga anelovírica a partir de una muestra biológica de dicho sujeto, y
- b) evaluar a partir de la determinación de la etapa a) el estado inmunosuprimido o no inmunosuprimido.

El término "inmunosupresión" (o "inmunodepresión" o "inmunodeficiencia"), como se usa aquí, se refiere a la reducción o supresión de la función del sistema inmunitario, es decir, la inmunosupresión representa generalmente un estado en el que se reduce o está ausente una función del sistema inmunitario específica y/o no específica del sujeto. Se puede debilitar la respuesta inmunitaria completa, o una población particular de los linfocitos inmunológicamente activos se puede ver afectada de forma selectiva. En algunos casos, el efecto puede ser preferentemente sobre células T en lugar de sobre células B. Si se ven afectadas las células B, puede ser sobre una subclase específica de células productoras de anticuerpo. La inmunosupresión específica del antígeno puede ser el resultado de la eliminación o supresión de un clon particular de células específicas de un antígeno, o el resultado de una regulación aumentada de la respuesta inmunitaria por células supresoras específicas del antígeno. También puede ser el resultado de una mayor producción de anticuerpo antiidiotípico.

La inmunosupresión puede resultar de ciertas enfermedades tales como SIDA o linfoma, o de ciertos fármacos tales como algunos de los usados para tratar el cáncer. La inmunosupresión también se puede inducir deliberadamente con fármacos, como en la preparación para el trasplante de médula ósea o de otros órganos, para evitar el rechazo del trasplante. De este modo, la inmunosupresión según la invención puede ser de cualquier origen, tal como, por ejemplo, pero sin limitarse a, tratamiento inmunosupresivo, efectos secundarios inmunosupresivos de fármacos o terapia, incluyendo radioterapia, rasgos o enfermedades genéticas inmunosupresoras heredadas, enfermedades inmunosupresoras adquiridas tales como SIDA, cánceres tales como leucemia o linfoma.

Por "estado inmunosuprimido" se refiere aquí a una afección en la que la función del sistema inmunitario de un sujeto está reducida o ausente. De este modo, según la invención, se considera que los términos "inmunosuprimido", "inmunodeprimido", o "inmunocomprometido" tienen todos ellos el mismo significado. En una realización particular, el "estado inmunosuprimido" del sujeto significa la capacidad del sujeto para controlar la infección vírica, es decir, la capacidad del sujeto para prevenir la amplificación vírica a partir de dicha infección vírica.

Es difícil de evaluar de forma precisa el estado inmunosuprimido de un sujeto con los métodos de la técnica anterior. Esto puede conducir a situaciones en las que se administra a un paciente que lo necesita una dosis demasiado elevada de un tratamiento inmunosupresivo. También es posible que no se administre a un paciente

una dosis suficientemente elevada de un tratamiento inmunoestimulante, debido a que no se determinó correctamente el estado inmunosuprimido de dicho paciente. Las consecuencias para la salud del paciente son potencialmente graves en tal situación. Por ejemplo, los tratamientos inmunosupresores, cuando son inapropiados o inadecuados, pueden conducir a un estado de sobreinmunosupresión, lo que deja al paciente muy susceptible a las infecciones. Por otro lado, es importante ser capaces de identificar de forma fiable pacientes crónicamente inmunosuprimidos, a fin de proporcionarles el tratamiento más adecuado.

El método de la invención permite la determinación precisa del estado inmunosuprimido del sujeto, permitiendo que se personalice un tratamiento específico a las necesidades del paciente. La determinación previa del estado inmunosuprimido del paciente con el método de la invención conduce así a un tratamiento más seguro que los tratamientos diseñados en base a los métodos de la técnica anterior.

De este modo, la presente invención también se refiere a un método para diseñar un tratamiento de inmunomodulación para un sujeto, comprendiendo dicho método:

- a) determinar a partir de una muestra biológica de un sujeto la carga anelovírica, y
- b) evaluar a partir de la determinación de la etapa a) el estado inmunosuprimido o no inmunosuprimido, y
- c) diseñar el tratamiento de inmunomodulación según dicho estado inmunosuprimido o no inmunosuprimido evaluado en la etapa b).

La invención también se refiere a un método de tratamiento de una afección asociada con inmunodeficiencia. Como se usa aquí, "condiciones asociadas con inmunodeficiencia" o "trastornos de inmunodeficiencia" se refieren a un grupo diverso de afecciones caracterizadas principalmente por una mayor susceptibilidad a diversas infecciones oportunistas con enfermedad grave aguda, recurrente o crónica severa. En una primera realización, esta mayor susceptibilidad a infección resulta de la inmunosupresión debida a uno o más defectos en el sistema inmunitario. En este caso, la inmunosupresión no es deliberada. Los trastornos de inmunodeficiencia engloban, sin limitación, "síndromes de inmunodeficiencia", en los que todas las características son el resultado del defecto inmunitario, y "síndromes con inmunodeficiencia", en los que algunas características, incluso las más prominentes, no pueden ser explicadas por el defecto inmunitario. A título de ejemplo y no de limitación, las enfermedades y afecciones asociadas con inmunodeficiencia o inmunosupresión comprenden: infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), hipogammaglobulinemia, cánceres hematológicos tales como leucemia y linfoma, linfocitopenia (linfopenia) de cualquier origen, lupus eritematoso, caquexia, abuso de opioides, mastocitosis, fiebre reumática, tripanosomiasis, abuso de alcohol.

El grupo de trastornos de inmunodeficiencia también engloba enfermedades y afecciones asociadas con inmunosupresión que surgen de una disminución o prevención artificial, habitualmente controlada, de una respuesta inmunitaria del sujeto. De este modo, la supresión en los sujetos es inducida deliberadamente. Puede estar causada por tratamiento inmunosupresor, o puede aparecer como un efecto secundario de una terapia de otras indicaciones (por ejemplo, efecto secundario de la quimioterapia contra el cáncer). Estas últimas afecciones incluyen afecciones tales como ablación total de la médula ósea, trasplante de la médula ósea, trasplante de órganos, tratamiento con fármacos inmunosupresores tales como, entre otros, tacrolimus, ciclosporina, metotrexato, micofenolato, azatiprina, interferones, e inmunoglobulinas tales como anti-CD20 y anti-CD3; y tratamientos con: agentes quimioterapéuticos, corticosteroides, fármacos anti-TNF, radiación.

De este modo, la presente invención también se refiere a un método para tratar una afección asociada con inmunodeficiencia en un sujeto, comprendiendo dicho método:

- a) determinar el estado inmunosuprimido o no inmunosuprimido de dicho sujeto según los métodos de la invención, y
- b) adaptar un tratamiento de inmunomodulación al mencionado sujeto.

De este modo, la presente invención se refiere a un tratamiento de inmunomodulación para su uso en el tratamiento de una afección asociada con inmunodeficiencia en un sujeto, en el que el uso comprende las etapas siguientes:

- a) el estado inmunosuprimido o no inmunosuprimido de dicho sujeto se determina según los métodos de la invención, y
- b) dicho tratamiento de inmunomodulación se adapta al mencionado sujeto.

En otras palabras, la invención se refiere al uso de un tratamiento de inmunomodulación en la preparación de un medicamento para tratar una afección asociada con inmunodeficiencia en un sujeto, en el que:

a) el estado inmunosuprimido o no inmunosuprimido de dicho sujeto se determina según los métodos de la invención, y

5 b) dicho tratamiento de inmunomodulación se adapta al mencionado sujeto.

Por "tratamiento de inmunomodulación" se quiere decir aquí cualquier tratamiento destinado a inducir, potenciar, inhibir o suprimir una función inmunitaria. Según una realización preferida, un tratamiento de inmunomodulación es un tratamiento inmunosupresor. Según otra realización preferida, un tratamiento de inmunomodulación es un

10 tratamiento inmunoestimulante.

Por "tratamiento inmunosupresor" se quiere decir aquí cualquier tratamiento destinado a inhibir o suprimir una función inmunitaria de un sujeto que sería adversa a un resultado clínico deseado. Los tratamientos inmunosupresores incluyen, por ejemplo, tratamientos que están destinados a inducir la deficiencia de la función

15 inmunitaria en un sujeto a fin de tratar dicho sujeto con un trasplante de células o de un órgano. También incluyen, por ejemplo, tratamientos que inducen deficiencia de la función inmunitaria como efecto secundario, tal como quimioterapia o radioterapia. Los tratamientos inmunosupresores a los que se refiere la invención usan glucocorticoides, fármacos antiproliferativos y antimetabólicos (rapamicina, everolimus, micofenolato mofetilo, ácido micofenólico), inhibidores de calcineurina (ciclosporina, FK506, voclosporina), agonistas de S1P-R (FTY720), malononitrilamidas (FK7778), y anticuerpos (por ejemplo, globulina antitimocítica), incluyendo anticuerpos monoclonales (por ejemplo muromonab-CD3, daclizumab, basiliximab, rituximab, alemtuzumab, infliximab, adalimumab, efalizumab).

Un "tratamiento inmunoestimulante", según la presente invención, es cualquier tipo de tratamiento destinado a

25 inducir o potenciar la función inmunitaria. Los tratamientos inmunoestimulantes incluyen tratamientos que estimulan la respuesta inmunitaria específica, tratamientos que estimulan la respuesta inmunitaria no específica, y tratamientos que estimulan las respuestas inmunitarias tanto específicas como no específicas. Tales tratamientos inmunoestimulantes se administran habitualmente para tratar afecciones asociadas con inmunosupresión no deliberada. Los tratamientos inmunoestimulantes a los que se refiere la invención usan

30 pequeñas moléculas sintéticas (poli I:C, levamisol, inosina pranobex) a microorganismos vivos (*Corynebacterium parvum*), e incluyen mezclas complejas de componentes bacterianos con aceites minerales (adyuvante de Freund) o sales inorgánicas (hidróxido/fosfato de aluminio y magnesio), y, más recientemente, proteínas recombinantes que modulan la inmunidad (por ejemplo, citocinas, anticuerpos contra receptores celulares). Según la presente invención, los tratamientos antivirales también son considerados tratamientos

35 inmunoestimulantes. Los tratamientos antivirales incluyen, por ejemplo, oseltamivir (Tamiflu), zanamivir (Relenza), interferón, que inhibe la síntesis vírica en células infectadas, particularmente alfa-interferón, usado en el tratamiento de hepatitis B y C.

De este modo, en una realización del método de la invención, el tratamiento de inmunomodulación es un

40 tratamiento inmunosupresor. En otra realización del método de la invención, el tratamiento de inmunomodulación es un tratamiento inmunoestimulante.

Dicha adaptación del tratamiento de inmunomodulación puede ser una reducción o supresión del mencionado

45 tratamiento de inmunomodulación, o la continuación del mencionado tratamiento de inmunomodulación a la misma dosis o a una mayor. La persona experta apreciará que el tratamiento se continuará si no se logra el efecto deseado sobre el sistema inmunitario del sujeto. Por ejemplo, cuando el tratamiento se administra para estimular la función del sistema inmunitario a fin de compensar un déficit de la misma, el tratamiento se continúa si el paciente muestra un fenotipo inmunosuprimido. Igualmente, un tratamiento inmunosupresor se continuará si el sujeto presenta un estado no inmunosuprimido. Por otro lado, el tratamiento se reducirá o se suprimirá si se ha

50 logrado el efecto deseado sobre el sistema inmunitario del sujeto. Este es el caso, por ejemplo, cuando el tratamiento busca obtener inmunosupresión a fin de llevar a cabo, por ejemplo, un trasplante de órgano, mientras el sujeto muestra un estado de inmunosupresión.

En una realización preferida, la afección asociada con inmunodeficiencia es rechazo de trasplante.

55 De este modo, la invención se refiere a un método para tratar o prevenir el rechazo de trasplante en un sujeto transplantado, comprendiendo dicho método:

a) determinar el estado inmunosuprimido o no inmunosuprimido de dicho sujeto transplantado según los

60 métodos de la invención, y

b) adaptar un tratamiento inmunosupresor al mencionado sujeto transplantado.

De este modo, la presente invención proporciona un tratamiento inmunosupresor para su uso en el tratamiento o

65 prevención de rechazo de trasplante en un sujeto transplantado, en el que dicho uso comprende las etapas siguientes:

a) determinar el estado inmunosuprimido o no inmunosuprimido de dicho sujeto transplantado según los métodos de la invención, y

5 b) adaptar dicho tratamiento inmunosupresor al mencionado sujeto transplantado.

En otras palabras, la invención se refiere al uso de un tratamiento inmunosupresor en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir rechazo de transplante en un sujeto transplantado, en el que:

10 a) el estado inmunosuprimido o no inmunosuprimido de dicho sujeto transplantado se determina según los métodos de la invención, y

b) dicho tratamiento inmunosupresor se adapta al mencionado sujeto transplantado.

15 En otra realización preferida, la afección asociada con inmunodeficiencia es una infección.

De este modo, esta realización se refiere a un método para tratar una infección en un sujeto infectado, comprendiendo dicho método:

20 a) determinar el estado inmunosuprimido o no inmunosuprimido de dicho sujeto infectado según los métodos de la invención, y

b) adaptar un tratamiento inmunoestimulante al mencionado sujeto infectado.

25 De este modo, la presente invención proporciona un tratamiento inmunoestimulante para su uso en el tratamiento de una infección en un sujeto infectado, en el que el uso comprende las etapas siguientes:

a) determinar el estado inmunosuprimido o no inmunosuprimido de dicho sujeto transplantado según los métodos de la invención, y

30 b) adaptar dicho tratamiento inmunoestimulante al mencionado sujeto.

En otras palabras, la invención se refiere al uso de un tratamiento inmunoestimulante en la preparación de un medicamento para tratar una infección en un sujeto infectado, en el que:

35 a) el estado inmunosuprimido o no inmunosuprimido de dicho sujeto transplantado se determina según los métodos de la invención, y

b) dicho tratamiento inmunoestimulante se adapta al mencionado sujeto transplantado.

40 Un anelovirus según la invención es un virus sin cubierta, con un genoma de ADN monocatenario circular pequeño, que se replica a través de intermedios bicatenarios, y que puede contener hasta 4 marcos de lectura abiertos: ORF1, ORF2, ORF3 y ORF4. Los marcos de lectura abiertos (ORF) 1 (largo) y 2 (corto) solapan parcialmente. ORF3 y ORF4 son más pequeños. Los anelovirus se subagrupan en torque teno virus (TTV), torque teno mini virus (TTMV), y torque teno midi virus (TTMDV), con hospedantes conocidos que incluyen seres humanos, primates no humanos y animales domésticos (Biagini et al., J Gen Virol, 88: 2696-2701, 2007; Hino y Miyata, Rev Med Virol, 17: 45-57, 2007; Leary et al., J Gen Virol, 80: 2115-2120., 1999).

50 Por "anelovirus", se hace referencia aquí a cualquier virus que pertenezca a la familia de virus *Anelloviridae*, incluyendo, pero sin limitarse a, los Teno virus (TTVs), los Torque Teno midivirus (TTMDVs), y los Torque Teno minivirus, también conocidos antiguamente como minivirus similares a Torque Teno (TTMVs). La cepa prototípica de Torque Teno Virus (TTV-1a) tiene un tamaño genómico de 3853 nucleótidos. La cepa prototípica de Torque Teno Minivirus, antiguamente conocida como minivirus similar a TTV (TTMV-NLC030), tiene un tamaño genómico de 2915 nucleótidos. Finalmente, se ha descrito el Torque Teno Midivirus, con un genoma de 3242 nucleótidos para la cepa prototípica (TTMDV-MD1-073). Los anelovirus son muy variables en secuencia. Por ejemplo, las secuencias nucleotídicas de los genomas de longitud completa de TTV pueden variar en un 40%, y las de TTMDV en un 33%.

60 La "carga viral", según la invención, es el número de secuencias de ácidos nucleicos de un virus presentes en una muestra biológica. La carga viral refleja la gravedad de una infección vírica. Preferentemente, la carga viral se refiere a la proporción de secuencias de ácidos nucleicos en una muestra biológica que pertenecen al mencionado virus. Más preferentemente, la carga viral representa el número de copias del mencionado virus en una muestra biológica. La carga viral se puede determinar, por ejemplo, estimando la cantidad del virus en una muestra biológica procedente de un sujeto.

65 Como se usa aquí, el término "sujeto" se refiere a un vertebrado, preferentemente un mamífero, y lo más

preferentemente a un ser humano.

Por "muestra biológica", se hace referencia aquí a cualquier muestra que se tome de un sujeto, que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, sangre, suero, plasma, esputo, orina, heces, piel, fluido cerebroespinal, saliva, secreciones gástricas, semen, fluido seminal, lágrimas, tejido o fluido espinal, fluido cerebral, muestra de ganglio trigeminal, una muestra de ganglio sacro, tejido adiposo, tejido linfóide, tejido placentario, tejido del aparato reproductor superior, tejido del tubo digestivo, tejido de genitales masculinos, y tejido del sistema nervioso central fetal. Preferentemente, la muestra biológica es sangre o deriva de sangre, tal como plasma o suero.

Según la invención, la carga anelovírica en un sujeto significa la carga vírica de cualquier virus de la familia *Anelloviridae* hospedado por dicho sujeto. De este modo, la determinación de la carga anelovírica en un sujeto según la invención comprende estimar el número de secuencias de cualquier virus de la familia *Anelloviridae* en una muestra biológica procedente de dicho sujeto. En particular, no hay ninguna selección, según la invención, de especies anelovíricas específicas a medir en dicha muestra biológica. Preferentemente, determinar la carga anelovírica comprende determinar la cantidad de copias víricas activas y/o inactivas. Comprende determinar la cantidad de copias víricas circulantes, integradas, o latentes. Más preferentemente, la carga anelovírica corresponde a copias circulantes de anelovirus.

Los niveles de anelovirus se pueden determinar midiendo los niveles de ADN anelovírico, ARN anelovírico, o proteínas anelovíricas. El método según la invención puede comprender así otra etapa preliminar, entre la toma de la muestra procedente del paciente y la etapa a) como se define anteriormente, que corresponde a la transformación de la muestra biológica en una muestra de ADN bicatenario (ADNbc), o en una muestra de ARNm (o ADNc correspondiente), o en una muestra proteica, que entonces está lista para el uso para la detección *in vitro* de anelovirus en la etapa a). Dicho ADNbc puede corresponder a todo el genoma del anelovirus, o solamente a una porción del mismo. Una vez que se dispone de un ADNbc, ARNm (o ADNc correspondiente) o una muestra proteica listos para el uso, la detección del anelovirus se puede llevar a cabo, dependiendo del tipo de transformación y de la muestra disponible lista para el uso, a nivel del ADN genómico (es decir, basado en la presencia de por lo menos una secuencia que consiste en por lo menos una parte del genoma del anelovirus), a nivel del ARNm (es decir, basado en el contenido de ARNm de la muestra), o a nivel proteico (es decir, basado en el contenido proteico de la muestra).

Preferentemente, los niveles de anelovirus se determinan midiendo los niveles de ADN anelovírico.

Los métodos para detectar un ácido nucleico en una muestra biológica incluyen, entre otros, la hibridación con una sonda marcada, la amplificación, incluyendo amplificación mediante PCR, la secuenciación, y todos los otros métodos conocidos por la persona de pericia en la técnica. La cantidad de transcritos de ácido nucleico se puede medir mediante cualquier tecnología conocida por la persona experta. En particular, la medida se puede llevar a cabo directamente sobre una muestra de ARN mensajero (ARNm) extraída, o sobre ADN complementario (ADNc) retrotranscrito preparado a partir de ARNm extraído, mediante tecnologías bien conocidas en la técnica. A partir de la muestra de ARNm o de ADNc, la cantidad de transcritos de ácido nucleico se puede medir usando cualquier tecnología conocida por una persona experta en la técnica, incluyendo micromatrices nucleicas, PCR cuantitativa, e hibridación con una sonda marcada.

En una primera realización de la invención, los niveles de ADN anelovírico se miden mediante secuenciación. Como se usa aquí, el término "secuenciación" se usa en un sentido amplio, y se refiere a cualquier técnica conocida por la persona experta, incluyendo, pero sin limitarse a, secuenciación de terminación de cadena o didesoxi de Sanger, secuenciación de genoma completo, secuenciación mediante hibridación, pirosecuenciación, electroforesis capilar, secuenciación cíclica, secuenciación de extensión de una sola base, secuenciación en fase sólida, secuenciación de alto rendimiento, secuenciación distintiva masivamente paralela (MPSS), secuenciación mediante terminador reversible marcado con colorante, secuenciación de extremos pareados, secuenciación de término cercano, secuenciación con exonucleasas, secuenciación mediante ligación, secuenciación de lectura corta, secuenciación de una sola molécula, secuenciación mediante síntesis, secuenciación en tiempo real, secuenciación mediante terminador inverso, secuenciación por nanoporos, secuenciación 454, secuenciación mediante analizador del genoma de Solexa, secuenciación SOLID(R), secuenciación MS-PET, espectrometría de masas, y combinaciones de las mismas.

Opcionalmente, el ADN se fragmenta aleatoriamente, generalmente mediante métodos físicos, antes de la secuenciación. El ADN anelovírico se puede secuenciar mediante cualquier técnica conocida en la técnica, incluyendo secuenciación mediante ligación, pirosecuenciación, secuenciación mediante síntesis, o secuenciación de una sola molécula. La secuenciación también incluye técnicas a base de PCR, tales como, por ejemplo, PCR cuantitativa o PCR en emulsión.

La secuenciación se lleva a cabo sobre todo en ADN contenido en la muestra biológica, o sobre porciones del ADN contenido en la muestra biológica. Estará claro inmediatamente para la persona experta que dicha muestra contiene por lo menos una mezcla de ADN anelovírico y de ADN procedente del sujeto hospedante. Además, es probable que el ADN adenovírico represente solamente una fracción pequeña del ADN total presente en la

muestra.

Un primer enfoque que aborda estos retos es secuenciar y cuantificar secuencias que se sabe que son específicas del genoma del anelovirus. De hecho, los inventores han identificado dos secuencias de consenso, representadas por SEC ID No. 4 y SEC ID No. 5, en base a la comparación entre todas las secuencias anelovíricas. Estas dos secuencias de consenso, que son capaces de hibridarse a todos los genomas anelovíricos, son así muy convenientes como cebadores para secuenciar dicho ADN del anelovirus.

De este modo, según esta realización, el método de la invención comprende usar para la secuenciación los cebadores de secuencias representadas por SEC ID No. 4 y SEC ID No. 5. En una realización preferida, el método de la invención comprende una etapa de cuantificar el número de lecturas.

En todavía una realización preferida adicional, el método de la invención comprende otra etapa adicional de normalizar dicho número de lecturas con respecto a una referencia. Dicha referencia puede ser cualquier secuencia de ADN conveniente que se pueda identificar y cuantificar, por ejemplo una secuencia de ADN hospedante o una secuencia exógena. Para la secuenciación cuantitativa, es particularmente ventajoso añadir al inicio en las muestras una cantidad conocida de ácidos nucleicos de referencia, ácidos nucleicos de referencia los cuales pasarán a través de todas las etapas de preparación de la muestra antes de la secuenciación. Las etapas de preparación de la muestra pueden comprender medios para proteger el ácido nucleico vírico y destruir los ácidos nucleicos del hospedante, por ejemplo usando diferentes nucleasas.

Aunque los mencionados cebadores se pueden usar en disolución, es preferible que los mencionados cebadores estén enlazados a un soporte sólido.

Para permitir su acoplamiento covalente al soporte, el cebador generalmente se funcionaliza. De este modo, se puede modificar mediante un grupo terminal tiólico, amínico o carboxílico en la posición 5' o 3'. En particular, la adición de un grupo tiólico, amínico o carboxílico hace posible, por ejemplo, acoplar el oligonucleótido a un soporte que posea funciones de disulfuro, de maleimida, de amina, carboxílica, de éster, epoxídica, de bromuro de cianógeno, o aldehídica. Estos acoplamientos se forman mediante el establecimiento de enlaces de disulfuro, de tioéter, de éster, de amida o de amina entre el cebador y el soporte. Se puede usar cualquier otro método conocido por la persona experta en la técnica, tal como, por ejemplo, reactivos de acoplamiento bifuncionales.

Además, para mejorar la hibridación con el oligonucleótido acoplado, puede ser ventajoso que el oligonucleótido contenga una secuencia "brazo" y una secuencia "espaciadora" de bases. El uso de un brazo hace posible, en efecto, unir el cebador a una distancia escogida desde el soporte, permitiendo que se mejoren sus condiciones de interacción con el ADN. El brazo consiste ventajosamente en una cadena de carbono lineal, que comprende 1 a 18, y preferentemente 6 o 12 grupos (CH₂), y una amina que permite la unión a la columna. El brazo está enlazado a un fosfato del oligonucleótido o de un "espaciador" compuesto de bases que no interfieren con la hibridación. De este modo, el "espaciador" puede comprender bases purínicas. Como ejemplo, el "espaciador" puede comprender la secuencia GAGG. El brazo está compuesto ventajosamente de una cadena de carbono lineal que comprende 6 o 12 átomos de carbono.

Para implementar la presente invención, se pueden usar diferentes tipos de soporte. Estos pueden ser soportes cromatográficos funcionalizados, a granel o empaquetados previamente en una columna, superficies plásticas funcionalizadas o perlas de látex funcionalizadas, magnéticas o de otro modo. Preferentemente se usan soportes cromatográficos. Como ejemplo, los soportes cromatográficos capaces de ser usados son agarosa, acrilamida, o dextrano, así como sus derivados (tales como sefadex, sefarosa, superosa, etc.), polímeros tales como poli(estireno/divinilbenceno), o sílice injertada o no injertada, por ejemplo. Las columnas de cromatografía pueden operar en el modo de difusión o de perfusión.

De este modo, en una realización particular, los cebadores anteriores representados por SEC ID No 4 y 5 comprenden además:

- un grupo funcional para el acoplamiento covalente al extremo 5' o 3', tal como, pero sin limitarse a, un grupo que comprende un grupo terminal tiólico, amínico o carboxílico;
- una molécula o secuencia espaciadora se añade en el extremo 5' o 3', molécula o secuencia espaciadora la cual es como se caracteriza anteriormente;
- opcionalmente, unas secuencias adicionales como secuencias índice o etiquetadoras para llevar a cabo las etapas de pre y posamplificación adicionales y generales que no dependen de las secuencias diana que se deben cuantificar.

Otro enfoque es usar un método que permita el genotipado cuantitativo con alta precisión de ácidos nucleicos obtenidos a partir de la muestra biológica. En una realización de este enfoque, la precisión se logra mediante análisis de un gran número (por ejemplo, millones o miles de millones) de moléculas de ácido nucleico sin

ninguna amplificación usando protocolos que se basan en el conocimiento previo de las secuencias diana (es decir, en este caso, secuencias de anelovirus). Una realización usa secuenciación de ADN masivamente paralela, tal como, pero sin limitarse a, la realizada por la plataforma Illumina Genome Analyzer (Bentley et al. Nature; 456: 53-59, 2008), la plataforma 454 de Roche (Margulies et al. Nature; 437: 376-380, 2005), la plataforma SOLiD de ABI (McKernan et al., Genome Res; 19: 1527-1541, 2009), la plataforma de secuenciación de una sola molécula de Helicos (Harris et al. Science; 320: 106-109, 2008), la secuenciación en tiempo real usando moléculas de polimerasa individuales (Science; 323: 133-138, 2009), la secuenciación Ion Torrent (documento WO 2010/008480; Rothberg et al., Nature, 475: 348-352, 2011), y la secuenciación con nanoporos (Clarke J et al. Nat Nanotechnol.; 4: 265-270, 2009). En una realización, la secuenciación masivamente paralela se lleva a cabo sobre un subconjunto aleatorio de moléculas de ácidos nucleicos en la muestra biológica.

En realizaciones específicas, el método de la invención se adapta para ejecutarlo en un secuenciador de ADN ABI PRISM(R) 377, un analizador genético ABI PRISM(R) 310, 3100, 3100-Avant, 3730, o 3730x1, un analizador de ADN ABI PRISM(R) 3700, o un sistema SOLiD(TM) de Applied Biosystems (todos ellos de Applied Biosystems), un sistema Genome Sequencer 20 (Roche Applied Science), un HiSeq 2500, un HiSeq 2000, un Genome Analyzer Iix, un MiSeq Personal Sequencer, un HiScanSQ (todos de Illumina), el Genetic Analysis System, que incluye el Single Molecule Sequencer, Analysis Engine y Sample Loader (todos de HeliScope), el secuenciador Ion Proton™, o el secuenciador Ion PGM™ (ambos de Ion Torrent). En una realización preferida de la invención, las secuencias anelovíricas se identifican en los datos de secuenciación global mediante comparación con secuencias de anelovirus depositadas públicamente. Esta comparación se basa ventajosamente en el nivel de identidad de secuencia con una secuencia de anelovirus conocida, y permite detectar variantes incluso distantes.

La expresión "identidad de secuencia" se refiere a la identidad entre dos péptidos o entre dos ácidos nucleicos. La identidad entre secuencias se puede determinar comparando una posición en cada una de las secuencias que se pueden alinear con fines comparativos. Cuando una posición de las secuencias comparadas está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las secuencias son idénticas en esa posición. Un grado de identidad de secuencia entre las secuencias de ácidos nucleicos es una función del número de nucleótidos idénticos en posiciones compartidas por estas secuencias. Un grado de identidad entre secuencias de aminoácidos es una función del número de secuencias de aminoácidos idénticas que se comparten entre estas secuencias. Puesto que dos polipéptidos pueden cada uno (i) comprender una secuencia (es decir, una porción de la secuencia polinucleotídica completa) que es similar entre dos polinucleótidos, y (ii) pueden comprender además una secuencia que es divergente entre dos polinucleótidos, las comparaciones de identidades de secuencia entre dos o más polinucleótidos a lo largo de una "ventana de comparación" se refieren al segmento conceptual de por lo menos 20 posiciones nucleotídicas contiguas en el que una secuencia polinucleotídica se puede comparar con una secuencia nucleotídica de referencia de por lo menos 20 nucleótidos contiguos, y en el que la porción de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, espacios vacíos) de 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para la comparación óptima. Por ejemplo, se pueden introducir espacios vacíos en la secuencia de la primera secuencia de aminoácidos o de una primera secuencia de ácido nucleico para el alineamiento óptimo con la segunda secuencia de aminoácidos o segunda secuencia de ácido nucleico. Entonces se comparan los restos de aminoácidos o los nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones nucleotídicas correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia es ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente a la segunda secuencia, las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias. Por tanto, % de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones que solapan X 100.

En esta comparación, las secuencias pueden tener la misma longitud, o ser de longitud diferente. El alineamiento óptimo de las secuencias para determinar una ventana de comparación se puede realizar mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (J. Theor. Biol., 91(2): 370-380, 1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homologías de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol., 48(3): 443-453, 1972), mediante la búsqueda de la similitud vía el método de Pearson y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85(5): 2444-2448, 1988), mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetic Computer Group, 575, Science Drive, Madison, Wisconsin), o mediante inspección. Se selecciona el mejor alineamiento (es decir, que ve como resultado el porcentaje más elevado de identidad a lo largo de la ventana de comparación) generado por los diversos métodos.

La expresión "identidad de secuencia" significa así que dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas son idénticas (es decir, en una base de nucleótido a nucleótido o de aminoácido a aminoácido) a lo largo de la ventana de comparación. La expresión "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas óptimamente a lo largo de la ventana de comparación, determinando el número de

posiciones en las que aparece la misma base de ácido nucleico (por ejemplo, A, T, C, G, U, o I) en ambas secuencias, para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. Se puede aplicar el mismo procedimiento a las secuencias polipeptídicas. El porcentaje de identidad de secuencia de una secuencia de ácido nucleico o de una secuencia de aminoácidos también se puede calcular usando el software BLAST (versión 2.06 de septiembre de 1998), con el parámetro por defecto o definido por el usuario.

De este modo, una secuencia que presente por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98%, por lo menos 99%, o 100% de identidad con una secuencia anelovírica conocida es identificada como una secuencia anelovírica. Según esta realización, la determinación de la carga anelovírica incluye así numerar las secuencias del anelovirus identificadas mediante la secuenciación en la muestra biológica del sujeto.

En una realización preferida, los niveles de ADN anelovírico se determinan midiendo el número de secuencias de ADN anelovírico presentes en la muestra biológica.

En una realización preferida adicional, el número de secuencias anelovíricas se normaliza con respecto al número total de secuencias identificadas mediante secuenciación en la muestra biológica. Por "normalizando con respecto al número total de secuencias", se quiere decir aquí que el número de secuencias anelovíricas se divide entre el número total de secuencias, es decir, tanto de origen anelovírico como no anelovírico, presentes en la muestra biológica. Según esta realización, una relación de secuencias anelovíricas a secuencias totales mayor que 0.2×10^{-4} indica que el sujeto está inmunosuprimido. En todavía otra realización preferida, el sujeto está inmunosuprimido si dicha relación es mayor que 0.5×10^{-4} , mayor que 1×10^{-4} , mayor que 5×10^{-4} , mayor que 10×10^{-4} , mayor que 15×10^{-4} , mayor que 20×10^{-4} , mayor que 25×10^{-4} , o mayor que 25×10^{-4} .

En otra realización, la determinación de la carga anelovírica incluye además la etapa de asignar cada secuencia anelovírica identificada mediante secuenciación a un genoma anelovírico específico, y numerar las copias de los genomas anelovíricos identificados de este modo. Asignar una secuencia a un genoma anelovírico específico quiere decir aquí el procedimiento de identificar el genoma anelovírico al que pertenece dicha secuencia. Ventajosamente, este procedimiento se lleva a cabo comparando dicha secuencia con las secuencias anelovíricas depositadas en bases de datos públicas.

Por "genomas anelovíricos" se quiere decir aquí los genomas de cualquier virus que pertenezca a la familia *Anelloviridae* de virus, que comprende los Torque Teno virus (TTVs), Torque Teno midivirus (TTMDVs), Torque Teno minivirus, también conocidos antiguamente como minivirus similares a Torque Teno (TTMVs).

En una realización, se refiere a genomas de TTVs, que comprenden alfatorquevirus, betatorquevirus, gammatorquevirus, deltatorquevirus, epsilontorquevirus, etatorquevirus, iotatorquevirus, thetatorquevirus, zetatorquevirus. En una realización preferida, se refiere al genoma de la cepa prototípica de Torque Teno virus, TTV-1a. Un ejemplo de un genoma de TTV es una secuencia tal como, por ejemplo, en el número de acceso Genbank AB017610, y representada en SEC ID No 1.

En otra realización, se refiere a genomas de TTMDVs. En una realización preferida, se refiere al genoma de la cepa prototípica de Torque Teno midivirus, a saber, el genoma del aislado MD1-073. Por ejemplo, un genoma de TTMDV puede tener una secuencia tal como, por ejemplo, en el número de acceso Genbank AB290918, y representada en SEC ID No 2.

En otra realización, se refiere a genomas de TTMVs. En una realización preferida, se refiere al genoma de la cepa prototípica de Torque Teno minivirus, a saber, el genoma del aislado TTMV- NLC-030. Un genoma de TTMV se ilustra mediante una secuencia tal como, por ejemplo, en el número de acceso Genbank AB038631, y representada en SEC ID No 3.

Es posible normalizar el número de genomas anelovíricos con respecto a por lo menos una secuencia, a fin de reducir la tasa de error cuando se comparan las cargas anelovíricas de dos muestras biológicas distintas. Por "normalizar con respecto a una secuencia", se quiere decir que el número de genomas anelovíricos identificados en la muestra biológica se divide entre el número de copias de dicha secuencia. Dicha secuencia puede ser, por ejemplo, una secuencia no humana cuyo número de copias es conocido. Como alternativa, dicha secuencia es una secuencia humana. Preferentemente, el número de genomas anelovíricos se normaliza con respecto al genoma humano completo. Por "genoma humano" se hace referencia aquí a una secuencia de consenso de referencia, tal como la secuencia que corresponde al Genome Reference Consortium built GRCh37 (NCBI build 37.1/assembly hg19).

En una realización preferida, la relación de genomas anelovíricos a genoma humano es mayor que 0.2%.

Como alternativa, el número de secuencias anelovíricas en una muestra dada se compara frente a un control

interno. Dicho control interno permite la evaluación de la calidad y del grado de secuenciación de las moléculas de ácidos nucleicos en dicha muestra. Preferentemente, dicho control interno consiste en una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia conocida, estando dicha molécula de ácido nucleico presente en dicha muestra en una concentración conocida. Más preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico es la molécula de ADN circular monocatenario genómico de un virus de secuencia y concentración conocidas en dicha muestra. Tal virus conocido puede ser, por ejemplo, un virus de la familia *Circoviridae*. La relación del número de secuencias de la muestra al control permite estimar el número absoluto de genomas anelovíricos de secuencia y concentración conocidas.

En otra realización, para determinar la carga anelovírica se usan técnicas de amplificación. Tales técnicas de amplificación incluyen, en particular, métodos isotérmicos y técnicas a base de PCR. Las técnicas isotérmicas incluyen métodos tales como, por ejemplo, amplificación a base de secuencias de ácido nucleico (NASBA), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), amplificación dependiente de helicasas (HDA), amplificación en círculo rodante (RCA), y amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), reacción de amplificación exponencial (EXPAR), amplificación de ácidos nucleicos isotérmica y quimérica iniciada por cebadores (ICANs), tecnología de amplificación de ARN mediada por señal (SMART), y otras (véase, por ejemplo, Asiello y Baeumner, Lab Chip; 11(8): 1420-1430, 2011). Preferentemente, la técnica de PCR usada mide cuantitativamente cantidades de partida de ADN, ADNc, o ARN. Los ejemplos de técnicas a base de PCR según la invención incluyen técnicas tales como, pero sin limitarse a, PCR cuantitativa (Q-PCR), reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), PCR con transcriptasa inversa cuantitativa PCR (QRT-PCR), o PCR digital. Estas técnicas son tecnologías bien conocidas y fácilmente disponibles para aquellos expertos en la técnica, y no necesitan una descripción precisa.

En una realización preferida, la determinación de la carga anelovírica se lleva a cabo mediante PCR cuantitativa.

En otra realización preferida, la determinación de la carga anelovírica se lleva a cabo mediante PCR digital. La PCR digital implica múltiples análisis de PCR sobre ácidos nucleicos extremadamente diluidos de manera que las amplificaciones más positivas reflejan la señal a partir de una sola molécula molde. La PCR digital permite así contar las moléculas molde individuales. La proporción de amplificaciones positivas entre el número total de PCRs analizadas permite una estimación de la concentración del molde en la muestra original o no diluida. Esta técnica se ha propuesto para permitir la detección de una variedad de fenómenos genéticos (Vogelstein et al., Proc Natl Acad Sci USA 96: 9236-924, 1999). Puesto que la cuantificación de la molécula molde mediante PCR digital no se basa en relaciones de respuesta frente a la dosis entre colorantes informadores y concentraciones de ácidos nucleicos, su precisión analítica es, por lo menos teóricamente, superior a la de la PCR en tiempo real. Por tanto, la PCR digital permite potencialmente discriminar grados más finos de diferencias cuantitativas entre loci diana y de referencia.

En otra realización, el método de la invención comprende una etapa adicional (a') de comparar la carga anelovírica de la etapa (a) con por lo menos una carga anelovírica de referencia. Según esta realización, la determinación del fenotipo inmunosuprimido o no inmunosuprimido se lleva a cabo gracias a la carga anelovírica obtenida con por lo menos una carga anelovírica de referencia en la etapa (a').

Según la invención, la "carga anelovírica de referencia" es una medida predeterminada de la carga anelovírica, obtenida a partir de una muestra biológica procedente de un sujeto con un estado inmunitaria conocido. Preferentemente, la carga anelovírica de referencia es una medida predeterminada de la carga anelovírica, obtenida de una muestra biológica procedente de un sujeto con un estado inmunosuprimido conocido. En una realización preferida, la carga anelovírica de referencia es una medida predeterminada de la carga anelovírica, obtenida a partir de una muestra biológica procedente de un sujeto que se sabe que está inmunosuprimido. En otra realización, la carga anelovírica de referencia es una medida predeterminada de la carga anelovírica, obtenida a partir de una muestra biológica procedente de un sujeto que se sabe que no está inmunosuprimido.

Preferentemente, por lo menos un perfil de expresión de referencia es una carga anelovírica de referencia inmunosuprimida. Como alternativa, por lo menos una carga anelovírica de referencia puede ser una carga anelovírica de referencia no inmunosuprimida. Más preferentemente, la determinación de la presencia o ausencia de un fenotipo inmunosuprimido se lleva a cabo mediante comparación con por lo menos una carga anelovírica de referencia inmunosuprimida y por lo menos una no inmunosuprimida. El diagnóstico o pronóstico se puede llevar a cabo así usando una carga anelovírica de referencia inmunosuprimida y una carga anelovírica de referencia no inmunosuprimida. Ventajosamente, para obtener un diagnóstico o pronóstico más sólido, dicho diagnóstico o pronóstico se lleva a cabo usando varias cargas anelovíricas de referencia inmunosuprimidas y varias cargas anelovíricas de referencia no inmunosuprimidas.

Según la invención, cualquier secuencia del genoma anelovírico se puede seleccionar como diana para la amplificación, a fin de determinar la carga anelovírica. Dicha secuencia se puede conservar entre las cepas víricas, o puede estar solamente presente en un grupo específico de cepas. En este último caso, es necesario amplificar igualmente otra secuencia presente en los otros grupos de las cepas de anelovirus. Preferentemente, la secuencia anelovírica amplificada está conservada entre la familia *Anelloviridae*, en cuyo caso se puede usar

un solo conjunto de cebadores para amplificar, en una única reacción, todas las cepas víricas presentes en la muestra biológica. Más preferentemente, se amplifica más de una secuencia conservada en la familia *Anelloviridae*, incrementando así la sensibilidad del ensayo.

5 En una realización específica, una secuencia de referencia es también seleccionada como diana para la amplificación, y se usa como control o como un estándar. Preferentemente, esta secuencia de referencia se escoge dentro del genoma humano.

10 En una realización preferida, la determinación de la carga anelovírica se lleva a cabo usando Q-PCR; por lo menos una secuencia de consenso del genoma anelovírico es seleccionada como diana para la amplificación.

15 Los cebadores se escogen por el experto en la técnica dependiendo de la especificidad deseada de la etapa de amplificación mediante PCR, usando parámetros estándar tales como el tamaño del ácido nucleico, los contenidos de GC, y las temperaturas de las reacciones. En una realización más preferida, cualquier secuencia anelovírica comprendida entre las secuencias de consenso representadas por SEC ID No. 4 y SEC ID No. 5 es seleccionada como diana para la amplificación. Incluso más preferentemente, la secuencia anelovírica comprendida entre las secuencias de consenso representadas por SEC ID No. 4 y SEC ID No. 5 es seleccionada como diana para la amplificación.

20 Se han identificado aquí dos secuencias de consenso, representadas por SEC ID No. 4 y SEC ID No. 5, en base a la comparación entre todas las secuencias anelovíricas. Preferentemente, cuando se lleva a cabo la amplificación, los cebadores de la amplificación comprenden cualesquiera cebadores capaces de unirse a un polinucleótido que tenga dichas secuencias de consenso SEC ID No. 4 o SEC ID No. 5, con la condición de que los mencionados cebadores sean diferentes de SEC ID No.6 y SEC ID No.7. Los mencionados cebadores comprenden entre 10 y 30 nucleótidos, preferentemente entre 15 y 25 nucleótidos, más preferentemente entre 20 y 25 nucleótidos. Los cebadores de la invención consisten en por lo menos 12, 15, 20 o 25 bases de SEC ID No. 4 o 5. Los parámetros para determinar la secuencia de cebadores exacta en base a la secuencia diana son bien conocidos por las personas de pericia en la técnica.

30 Aunque los mencionados cebadores se pueden usar en disolución, es preferible que los mencionados cebadores estén enlazados a un soporte sólido.

35 Para permitir su acoplamiento covalente al soporte, los cebadores generalmente están funcionalizados. De este modo, se puede modificar mediante un grupo terminal tiólico, amínico o carboxílico en la posición 5' o 3'. En particular, la adición de un grupo tiólico, amínico o carboxílico hace posible, por ejemplo, acoplar el oligonucleótido a un soporte que posee funciones de disulfuro, maleimida, amina, carboxilo, éster, epóxido, bromuro de cianógeno, o aldehído. Estos acoplamientos se forman mediante establecimiento de enlaces de disulfuro, de tioéter, de éster, de amida o de amina entre el cebador y el soporte. Se puede usar cualquier otro método conocido por una persona experta en la técnica, tal como, por ejemplo, reactivos de acoplamiento bifuncionales.

40 Además, para mejorar la hibridación con el oligonucleótido acoplado, puede ser ventajoso que el oligonucleótido contenga un "brazo" y una secuencia "espaciadora" de bases. El uso de un brazo hace posible, en efecto, unir el cebador a una distancia escogida desde el soporte, permitiendo que se mejoren sus condiciones de interacción con el ADN. El brazo consiste ventajosamente en una cadena de carbono lineal, que comprende 1 a 18, y preferentemente 6 o 12 grupos (CH₂), y una amina que permite la unión a la columna. El brazo está enlazado a un fosfato del oligonucleótido o de un "espaciador" compuesto de bases que no interfieren con la hibridación. De este modo, el "espaciador" puede comprender bases purínicas. Como ejemplo, el "espaciador" puede comprender la secuencia GAGG. El brazo está compuesto ventajosamente de una cadena de carbono lineal que comprende 6 o 12 átomos de carbono.

45 Para la implementación de la presente invención, se pueden usar diferentes tipos de soporte. Estos pueden ser soportes cromatográficos, a granel o empaquetados previamente en una columna, superficies plásticas funcionalizadas o perlas de látex funcionalizadas, magnéticas o de otro modo. Preferentemente se usan soportes cromatográficos. Como ejemplo, los soportes cromatográficos capaces de ser usados son agarosa, acrilamida, o dextrano, así como sus derivados (tales como sefadex, sefarosa, superosa, etc.), polímeros tales como poli(estireno/divinilbenceno), o sílice injertada o no injertada, por ejemplo. Las columnas de cromatografía pueden operar en el modo de difusión o de perfusión.

60 En otra realización de la invención, la cantidad de ADN anelovírico se determina usando hibridación específica de la secuencia. Los términos "hibridación" e "hibridando" se refieren al emparejamiento de dos moléculas de ácidos nucleicos monocatenarias complementarias (ARN y/o ADN), para dar una molécula bicatenaria. Como se usa aquí, se pueden hibridar dos moléculas de ácidos nucleicos, aunque el emparejamiento de bases no sea completamente complementario. En consecuencia, las bases con apareamiento erróneo no evitan la hibridación de dos moléculas de ácidos nucleicos, con la condición de que se usen condiciones apropiadas, bien conocidas en la técnica.

Las sondas son escogidas por la persona experta en la técnica dependiendo de la especificidad deseada de la especificidad de la etapa de detección, usando parámetros estándar tales como el tamaño del ácido nucleico y los contenidos de GC, las condiciones restrictivas de hibridación, y las reacciones de temperatura. Por ejemplo, cuando se desea obtener muchos resultados positivos en un intervalo de dianas homólogas, se usan condiciones poco restrictivas, mientras que para obtener resultados positivos solamente si el ácido nucleico diana específico está presente en la muestra, se prefieren condiciones de gran restricción.

Preferentemente, la sonda de la invención es capaz de hibridarse con un polinucleótido que tenga una secuencia representada mediante SEC ID No.4 o SEC ID No. 5, con la condición de que dicha sonda no tenga una secuencia representada por SEC ID No. 6 o SEC ID No. 7. Otro aspecto de la invención es la provisión de un polinucleótido que consista en por lo menos 12, 15, 20 o bases consecutivas representadas por SEC ID No. 4 o SEC ID No. 5.

Las sondas que se hibridan se pueden marcar con un marcador radioactivo, un marcador fluorescente, o un marcador químico. El ADN ramificado (ADNr), implica oligonucleótidos con estructuras ramificadas que permiten que cada oligonucleótido individual posea 35 a 40 marcadores (por ejemplo, enzimas de fosfatasa alcalina). Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, hibridaciones de ADN-ADN o ADN-ARN, amplificación mediante PCR, y técnicas de bioensayos o inmunoensayos de proteínas, que incluyen tecnologías a base de membranas, de disoluciones o de chips para la detección y/o cuantificación de secuencias de ácidos nucleicos o de proteínas. Tales métodos de hibridación de una sonda marcada con una molécula de ADN son bien conocidos por la persona de pericia en la técnica. Por ejemplo, cuando se desea obtener muchos resultados positivos en un intervalo de dianas homólogas, se usan condiciones poco restrictivas, mientras que para obtener resultados positivos solamente si el ácido nucleico diana específico está presente en la muestra, se prefieren condiciones de gran restricción. Como se usa aquí, la expresión “condiciones de hibridación restrictivas” se refiere a condiciones en las que la sonda se hibridará solamente a aquella secuencia diana exactamente complementaria, y que permiten la detección de la secuencia diana específica. Las condiciones de hibridación afectan a la estabilidad de los híbridos, por ejemplo temperatura, concentración salina, pH, concentración de formamida, y similares. Estas condiciones se optimizan para maximizar la unión específica y minimizar la unión no específica del cebador o sonda a su secuencia de ácido nucleico diana. Las condiciones restrictivas dependen de la secuencia, y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas se hibridarán específicamente a mayores temperaturas. En general, las condiciones restrictivas se seleccionan para que sean alrededor de 5°C menores que el punto de fusión término (T_m) para las secuencias específicas a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (a una fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de una secuencia diana complementaria se hibrida a una sonda o cebador perfectamente emparejado. Típicamente, las condiciones restrictivas serán aquellas en las que la concentración de sal sea menor que alrededor de 1.0 M de Na^+ , típicamente una concentración de alrededor de 0.01 a 1.0 M de Na^+ (u otras sales) a pH 7.0 a 8.3, y la temperatura es por lo menos alrededor de 30°C para sondas o cebadores cortos (por ejemplo 10 a 50 nucleótidos), y por lo menos alrededor de 60°C para sondas o cebadores largos (por ejemplo mayores que 50 nucleótidos). Las condiciones restrictivas se pueden lograr también con la adición de agentes desestabilizantes, tal como formamida. Las condiciones poco restrictivas ejemplares incluyen la hibridación con una disolución amortiguadora de 20-30% de formamida, 1 M de NaCl, 1% de SDS a 37°C y un lavado en 2XSSC a 40°C. Las condiciones de gran restricción ejemplares incluyen la hibridación en 40-50% de formamida, 1 M de NaCl, 1% de SDS a 37°C, y un lavado en 0.1*SSC a 60°C. La determinación de las condiciones particulares de hibridación con respecto a un ácido nucleico específico es rutinaria y bien conocida en la técnica, por ejemplo como se describe en Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3ª Ed., 2001; y Ausubel, Ed., *Short Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols; 5ª Ed., 2002.

En una realización preferida, la carga anelovírica se determina mediante el uso de una micromatriz nucleica.

Según la invención, una “micromatriz nucleica” consiste en diferentes sondas de ácidos nucleicos que están unidas a un sustrato, que puede ser una micromatriz, un portaobjetos de vidrio, o una perla del tamaño de una microesfera. Una micromatriz puede estar constituida por polímeros, plásticos, resinas, polisacáridos, sílice o materiales a base de sílice, carbono, metales, vidrios inorgánicos, o nitrocelulosa. Las sondas pueden ser ácidos nucleicos tales como ADNc (“micromatriz de ADNc”) u oligonucleótidos (“micromatriz oligonucleotídica”), y los oligonucleótidos pueden tener alrededor de 25 a alrededor de 60 pares de bases o menos de longitud.

Para determinar la cantidad de una muestra nucleica diana, dicha muestra se marca, se pone en contacto con la micromatriz en condiciones de hibridación, lo que conduce a la formación de complejos entre los ácidos nucleicos diana que son complementarios a las secuencias de la sonda unidas a la superficie de la micromatriz. Entonces se detecta la presencia de complejos hibridados marcados. Existen para el experto en la técnica muchas variantes de la tecnología de hibridación en micromatrices.

La práctica de la invención emplea, excepto que se indique de otro modo, técnicas convencionales o química proteica, virología molecular, microbiología, tecnología de ADN recombinante, y farmacología, que están dentro de la pericia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. (Véanse Ausubel et al.,

Short Protocols in Molecular Biology, Current Protocols; 5ª Ed., 2002; Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985; y Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3ª Ed., 2001). Las nomenclaturas usadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, biología molecular y celular, bioquímica de proteínas, enzimología, y química médica y farmacéutica, descritos aquí, son bien conocidos y se usan habitualmente en la técnica.

Los siguientes ejemplos se proporcionan aquí con fines solamente ilustrativos, y no pretenden ser limitantes excepto que se especifique de otro modo.

10 Ejemplos

Ejemplo 1

15 ANV como marcador de la inmunosupresión

Se cribaron muestras de plasma procedentes de pacientes que sufren diversas formas de inmunosupresión congénita, y procedentes de pacientes sin ninguna inmunosupresión conocida: el procedimiento de extracción se optimizó para el aislamiento de los genomas de ADN o ARN víricos sin descartar la identificación de ácidos nucleicos bacterianos y fúngicos. Se extrajo un volumen de 150 µl de cada muestra usando el kit Nucleospin RNA virus (Macherey-Nagel), que permite la recuperación tanto de ADN como de ARN, y entonces se amplificó mediante el ensayo de amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) a base de polimerasa del bacteriófago phi29 usando cebadores aleatorios.

Esta técnica permite la síntesis de ADN a partir de muestras de ADN, y también a partir de fragmentos de ADNc procedentes de genomas víricos reunidos previamente antes de MDA con la polimerasa de Phi29.

De forma breve, se siguió el protocolo del QuantiTect Whole Transcriptome Kit (Qiagen), excepto que la etapa de la síntesis de ADNc se llevó a cabo con cebadores hexaméricos aleatorios.

- 30 - Se incubó una mezcla con 8 µl de ARN, 1 µl de cebador (50 µM) y 1 µl de dNTPs (10 mM), a 75°C durante 5 min., y se enfrió en hielo durante 5 min.
- Después, se añadieron 10 µl de mezcla de enzimas 2X. Esta mezcla enzimática estaba compuesta de 2 µl de amortiguador RT 10 X para SSIII (Invitrogen Inc.), 4 µl de 25 mM de MgCl₂, 2 µl de 0.1 M de DTT, 1 µl de 40 U/µl de RNaseOUT (Invitrogen Inc.), 1 µl de transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen Inc.), y 0.5 µl de DMSO (Sigma-Aldrich).
- 35 - La mezcla final se incubó a 25°C durante 10 min., después a 45°C durante 90 min., y finalmente a 95°C durante 5 min.
- 40 - Todos los ADNc se almacenaron a -20°C, o se usaron inmediatamente.
- Las dos etapas siguientes (ligación y WGA) se llevaron a cabo con el QuantiTect® Whole Transcriptome kit (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

45 Esto proporciona concatémeros de ADN de alto peso molecular.

El ADN de alto peso molecular (5 µg), que resulta de la amplificación isotérmica del conjunto de los ADN genómicos y ADNc obtenidos a partir de los ARN genómicos como se describe anteriormente, se fragmentó en fragmentos de 200 a 350 nt, a los que se ligaron adaptadores. Los adaptadores incluyeron una etiqueta nucleotídica que permite multiplexar varias muestras por línea o canal. La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador GAI o HiSeq 2000 de Illumina.

55 La clasificación del flujo de secuencias de Illumina se realizó en primer lugar mediante un procedimiento de comparación de bases de datos sustractivo. Para este fin, toda la secuencia del genoma humano (NCBI build 37.1/assembly hg19) se escaneó con las lecturas usando SOAPaligner. También se llevó a cabo un estudio rápido y muy restrictivo mediante BLASTN, para eliminar lecturas adicionales del hospedante. Los mejores parámetros a usar se han determinado previamente. Se ha ensayado un número de programas de ensamblaje dedicados a lecturas de tamaño corto o medio (Velvet, SOAPdenovo, CLC), para determinar su eficiencia en nuestro proyecto. Se han establecido los parámetros óptimos. La comparación de las lecturas individuales y cónicas con datos genómicos y taxonómicos ya conocidos se realizó en bases de datos víricas, bacterianas y generalistas especializadas dedicadas, mantenidas localmente (bases de datos víricas y bacterianas de GenBank, nr). Las bases de datos mencionadas anteriormente se escanearon usando BLASTN y BLASTX. El preprocesamiento de datos para reducir los efectos de pequeños errores de observación (o asignación taxonómica) se basó en el ancestro mínimo común o a partir del mejor resultado, identificado a partir de los

mejores resultados entre lecturas individuales o cóntigos con un valor e significativo.

Los resultados con relación a lecturas individuales con valores e por debajo de 10^{-4} que tuvieron la mejor concordancia para un miembro conocido de la familia de Anelloviridae (ANV) se muestran en la tabla 1.

5 Como se muestra en la tabla 1, hemos identificado lecturas de ANV en 14/14 pacientes inmunodeficientes. De forma interesante, para un subconjunto de tres pacientes caracterizados con una supresión de células T inmunes importante, 20 a 54% del número total de lecturas fueron lecturas de anelovirus. Por el contrario, otros pacientes inmunocomprometidos que mostraron menores estados de inmunosupresión representaron < 0.2% de lecturas del anelovirus.

10 En 34 pacientes que no se conocía que estaban inmunocomprometidos, no se identificó ninguna lectura (o se identificaron menos de 5 lecturas), excepto en un conjunto de 4 pacientes: tres de ellos (100036, 100039, 080114/116) estaban desarrollando una encefalitis en el momento de la toma de muestras, una afección médica asociada frecuentemente con inmunosupresión.

15 Tabla 1: Número de lecturas individuales o de lecturas ensambladas en cóntigos identificados para pacientes con inmunosupresión o sin inmunosupresión conocida

Código	Muestra	Estado de inmuno-supresión	Número de lecturas	Lecturas de anelovirus	Relación anelo/total (x 10^{-4})
INMUNOSUPRESIÓN CONOCIDA					
100023	Plasma	SCID gamma C/hepatitis	5 132 262	191	0,37
100025	Plasma	SCID /infecciones por VPH	5 345 602	2 889 856	5406,04
100026	Plasma	Agammaglobulinemia de Bruton	3 091 732	94	0,30
100028	Plasma	SCID gamma C/encefalopatía	3 506 376	13	0,04
100029	Plasma	Linfopenia grave	6 467 110	3 299 612	5102,14
100030	Plasma	Enfermedad de Still atípica/fiebre de origen desconocido	12 029 412	13	0,01
100031	Plasma	Granulomatosis séptica	2 770 398	2 871	10,36
100061	Plasma	Linfopenia grave	9 184 316	526	0,57
100081	Plasma	Enfermedad de Griscelli e infección por CMV	8 540 162	5 272	6,17
100082	Fluido cerebroespinal	SCID Rag1	20 875 934	1 805	0,86
100083	Plasma	Linfopenia grave	9 643 096	16 129	16,73
100084	Plasma	Linfopenia grave	8 128 858	1 705 998	2098,69
100085	Plasma	Leucemia	6 410 912	286	0,45
100243	Frotis de piel	Linfopenia grave	39 942 410	132 761	33,24
CONTROLES					
100036	Plasma	NIL	13 564 262	187	0,14
100039	Plasma	NIL	6 071 374	915	1,51
080114/116	Plasma	NIL	9 633 342	164	0,17
100053	Plasma	NIL	7 375 016	0	0,00
100032	Plasma	NIL	7 148 184	0	0,00
100033	Plasma	NIL	3 348 242	4	0,01
100034	Plasma	NIL	14 198 534	0	0,00
100035	Plasma	NIL	13 905 700	0	0,00
100037	Plasma	NIL	13 784 866	0	0,00
100038	Plasma	NIL	27 941 897	0	0,00
100062	Plasma	NIL	12 098 932	2	0,00
100063	Plasma	NIL	8 701 704	1	0,00
100064	Plasma	NIL	7 976 148	0	0,00
100066	Plasma	NIL	8 052 770	156	0,19
100067	Plasma	NIL	10 354 496	2	0,00
100069	Plasma	NIL	9 107 144	0	0,00
100070	Plasma	NIL	8 196 240	2	0,00
100072	Plasma	NIL	7 588 712	0	0,00
100073	Plasma	NIL	10 281 130	0	0,00
100192	Plasma	NIL	28 726 064	0	0,00
100236	Plasma	NIL	4 818 410	0	0,00

Código	Muestra	Estado de inmuno-supresión	Número de lecturas	Lecturas de anelovirus	Relación anelo/total (x 10 ⁻⁴)
100237	Plasma	NIL	6 047 999	0	0,00
100238	Plasma	NIL	4 742 180	0	0,00
100239	Plasma	NIL	4 837 188	0	0,00
100240	Plasma	NIL	5 281 443	0	0,00
100241	Plasma	NIL	9 226 049	0	0,00

Ejemplo 2

Identificación de secuencias conservadas entre genomas de los ANV

5 Se construyó una base de datos de secuencias de ANV. Estaba compuesta por 7,003 secuencias nucleotídicas asignadas a la familia de *Anelloviridae*. 6938 secuencias proceden de la base de datos pública de NCBI (NT, 1º de octubre de 2011). 65 secuencias proceden del ensamblaje *de novo* de lecturas de NGS derivadas de nuestro propio trabajo (véase la tabla 1) que se asignaron a la familia de *Anelloviridae*. Estas secuencias tienen una longitud mínima de 1000 nucleótidos.

10 En un análisis preliminar usando un conjunto corto de secuencias, las secuencias que están próximas a un sitio de unión a un factor transcripcional (denominado caja TATA) parecen conservadas entre las cepas. Para extender aún más este análisis, y a fin de reducir el tamaño de la base de datos, se llevó a cabo un filtro basado en la presencia de la caja TATA. Este motivo es rico en A/T, y estaba situado en dirección 5' del sitio de comienzo de la transcripción.

15 Se construyó una secuencia de consenso de la caja TATA, usando las siguientes secuencias: ATAAAA, ATAAAT, ATATAA, ATATAT.

20 Este motivo se usó como un anclaje a fin de:

- 25 1. Filtrar la base de datos de anelovirus. Con este consenso se llevó a cabo una búsqueda con una matriz de peso específico de la posición. Se descartó la secuencia sin una coincidencia exacta.
2. Alinear previamente secuencias nucleotídicas largas. Las secuencias seleccionadas previamente se alinearon al comienzo del consenso de TATA (+1).

30 Esta etapa de filtración redujo la base de datos a:

- 42 secuencias obtenidas del NCBI.
- 8 secuencias obtenidas de nuestros propios experimentos de NGS y del ensamblaje *de novo*.

35 Se realizó un segundo alineamiento con MUSCLE (parámetros por defecto). Se identificaron dos regiones conservadas en la posición [+20: +53] y en la posición [+121: +151] con respecto al consenso de la caja TATA.

40 A continuación se muestran los detalles de estas alineaciones. Cada línea corresponde a una posición nucleotídica específica. Las columnas representan respectivamente los recuentos de A, C, G y T en esta posición. Las líneas con una estrella corresponden a una posición bien conservada. La ambigüedad nucleotídica se mostró usando un corchete. La última columna es el nucleótido de consenso en cada posición usando la nomenclatura de la IUAPAC.

45 Tabla 2: Nomenclatura de IUAPAC

Código del nucleótido	Base
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T (o U)	Timina (o Uracilo)
R	A o G
Y	C o T
S	G o C
W	A o T
K	G o T
M	A o C

ES 2 708 782 T3

B	C o G o T
D	A o G o T
H	A o C o T
V	A o C o G
N	Cualquier base
o -	espacio vacío

• Primera región: ANV-PTQ-1

A	C	G	T		
0	0	50	0	* G	G
50	0	0	0	* A	A
50	0	0	0	* A	A
0	0	0	50	* T	T
0	0	50	0	* G	G
0	0	50	0	* G	G
0	37	0	13	[CT]	Y
13	0	0	37	[AT]	W
0	0	50	0	* G	G
50	0	0	0	* A	A
0	0	50	0	* G	G
0	0	0	50	* T	T
0	0	0	50	* T	T
0	0	0	50	* T	T
0	2	0	11	[CT]	Y
14	0	0	36	[AT]	W
0	36	0	14	[CT]	C
0	24	14	12	[CGT]	B
23	14	0	13	[ACT]	H
0	49	1	0	C	C
0	0	50	0	* G	G
0	50	0	0	* C	C
10	37	0	3	[AC]	C
2	35	12	1	[CG]	S
0	0	50	0	* G	G
4	0	0	36	[AT]	T
0	38	0	12	[CT]	Y
0	36	14	0	[CG]	S
0	0	50	0	* G	G
0	36	0	12	[CT]	Y
36	0	14	0	[AG]	R
0	0	50	0	* G	G
18	1	0	0	[AT]	A

5 • Segunda región: ANV-PTQ-2

A	C	G	T		
50	0	0	0	* A	A
0	38	12	0	[CG]	S

ES 2 708 782 T3

0	50	0	0	* C	C
0	0	50	0	* G	G
16	21	12	1	[ACG]	V
50	0	0	0	* A	A
0	0	50	0	* G	G
0	0	0	50	* T	T
0	50	0	0	* C	C
49	0	0	1	* A	A
50	0	0	0	* A	A
0	0	50	0	* G	G
0	0	50	0	* G	G
0	0	50	0	* G	G
0	0	50	0	* G	G
0	50	0	0	* C	C
38	10	0	2	[AC]	M
38	0	0	12	[AT]	W
12	0	0	38	[AT]	W
0	0	0	50	* T	T
0	50	0	0	* C	C
0	0	50	0	* G	G
0	0	50	0	* G	G
0	0	50	0	* G	G
0	50	0	0	* C	C
16	0	10	24	[AGT]	D
2	36	12	0	[CG]	S
0	0	50	0	* G	G
1	12	37	0	[CG]	S
0	0	10	4	[GT]	K
1	12	37	0	[CG]	S
0	0	10	4	[GT]	G
0	2	12	0	G	G
2	2	0	10	T	T
12	0	37	0	[AG]	R
46	0	0	3	A	A

De este modo, hemos identificado las dos secuencias de consenso siguientes que están conservadas entre las cepas anelovíricas.

5 ANV-PTQ-2 5' ASCGVAGTCAAGGGGCMWWTCGGGCDSGSKSGGTRA 3' (SEC ID No.4)

ANV-PTQ-1 5' GAATGGYWGAGTTTYWCBHCGCCSGTYSGYRGA 3' (SEC ID No.5)

10 De este modo, los cebadores se pueden definir dentro de las siguientes secuencias, y se pueden usar para desarrollar las PCR para evidenciar un amplio intervalo de genoma de los ANV.

Ejemplo 3

15 Se enrolaron por lo menos 50 y hasta 200 pacientes inmunocomprometidos del hospital Necker (París) que sufren una enfermedad infecciosa. La inmunosupresión en estos pacientes es debida a un defecto congénito, a tratamientos inmunosupresores tras transplante de órgano sólido o de médula ósea, o a evolución de un cáncer.

Se lleva a cabo una secuenciación de alto rendimiento en el plasma de cada paciente para evaluar la etiología de la enfermedad y la carga de anelovirus como marcador potencial de la inmunosupresión. El número de lecturas específicas para anelovirus se cuantifica y se correlaciona con el nivel de inmunosupresión de cada paciente y con la progresión de la enfermedad.

5 Los pacientes no inmunocomprometidos sirven como controles.

Se observa que cargas elevadas de anelovirus en pacientes se correlacionan con una mayor inmunosupresión.

10 **Listado de secuencias**

<110> INSTITUT PASTEUR ELOIT, Marc CHEVAL, Justine HERBERT, Charles LECUIT, Marc

15 <120> CUANTIFICACIÓN DEL GENOMA DE ANELOVIRUS COMO BIOMARCADOR DE LA INMUNOSUPRESIÓN

<130> 362945D30586

20 <150> EP12305462.9
<151> 2012-04-20

<160> 7
<170> PatentIn version 3.5

25 <210> 1
<211> 3853
<212> DNA
<213> Torque teno virus

30 <400> 1

```

at t t t t g c t a c   g t c a c t a a c c   a c g t g a c a c c   c a c a g g c c a a   c c g a a t g c t a   t g t c a t c c a t           60
t t c c t g g g c c   g g g t c t a c g t   c c t c a t a t a a   g t a a g t g c a c   t t c c g a a t g g   c t g a g t t t t c           120
c a c g c c c g t c   c g c a g c g g t g   a a g c c a c g g a   g g g a g a t c t c   c g c g t c c c g a   g g g c g g g t g c           180
c g a a g t g a g   t t t a c a c a c c   g a a g t c a a g g   g g c a a t t c g g   g c t c g g g a c t   g g c c g g g c t a           240
t g g g c a a g g c   t c t g a a a a a a   g c a t g t t t a t   t g g c a g g c a t   t a c a g a a a g a   a a a g g g c g c t           300
g t c a c t g t g t   g c t g t g c g a a   c a a c a a a g a a   g g c t t g c a a a   c t a c t a a t a g   t a a t g t g g a c           360
c c c a c c t o g c   a a t g a t c a a c   a c t a c c t t a a   c t g g c a a t g g   t a c t c a a g t a   t a c t t a g c t c           420
c c a c g c t g c t   a t g t g c g g g t   g t c c c g a c g c   t g t c g e t c a t   t t t a a t c a t c   t t g c t t c t g t           480
g c t t c g t g c c   c c g c a a a a c c   c a c c c c c t c c   c g g t c c c c a g   c g a a a c c t g c   c c c t c c g a c g           540
g c t g c c c g g c t   c t c c c g g g c t g   c g c c a g a g g c   g c c c g g a g a t   a g a g c a c c a t   g g c c t a t g g c           600
t g g t g g c g c c   g a a g g a g a a g   a c g g t g g c g c   a g g t g g a g a c   g c a g a c c a t g   g a g g c g c c g c           660
t g g a g g a c c c   g a a g a c g c a g   a c c t g c t a g a   c g c c g t g g c c   g c c g c a g a a a   c g t a a g g a g a           720
c g c c g c a g a g   g a g g g a g g t g   g a g g a g a g a   t a t a g a g a t   g g a a a g a a a   g g g c a g g c g c           780
a g a a a a a a a g   c t a a a a t a a t   a a t a a g a c a a   t g g c a a c c a a   a c t a c a g a a g   g a g a t g t a a c           840
a t a g t a g g c t   a c a t c c c t g t   a c t a a t a t g t   g g c g a a a a t a   c t g t c a g c a g   a a a c t a t g c c           900
a c a c a c t c a g   a c g a t a c c a a   c t a c c c a g g a   c c c t t t g g g g   g g g g t a t g a c   t a c a g a c a a a           960
t t t a c t t t a a   g a a t t c t g t a   t g a c g a g t a c   a a a a g g t t t a   t g a a c t a c t g   g a c a g c a t c t           1020
a a c g a a g a c c   t a g a c c t t t g   t a g a t a t c t a   g g a g t a a a c c   t g t a c t t t t t   c a g a c a c c c a           1080
g a t g t a g a t t   t t a t c a t a a a   a a t t a a t a c c   a t g c c t o c t t   t t c t a g a c a c   a g a a c t c a c a           1140
    
```

ES 2 708 782 T3

gccctagca tacaccagc catgctagcc ctagacaaaa gagcaagatg gatacctagc 1200
 ttaaaatcta gaccgggaaa aaaacactat attaaaataa gagtaggggc accaagaatg 1260
 ttcactgata aatggtaccc ccaaacagat ctttgtgaca tggtgcttct aactgtctat 1320
 gcaaccgcag cggatagca atatccggtc ggctcaccac taactgactc tgtggttgtg 1380
 aacttccagc ttctgcaatc catgtatgat aaaacaatta gcatattacc agacgaaaaa 1440
 tcacaagag aaattctact taacaagata gcaagttaca ttccctttta taataccaca 1500
 caaactatag cccaattaaa gccatttata gatgcaggca atgtaacatc aggcgcaaca 1560
 gcaacaacat gggcatcata cataaacaca accaaattta ctacagcaac cacaacaact 1620
 tatgcatatc caggcaccaa cagaccccca gtaactatgt taacctgtaa tgactcctgg 1680
 tacagaggaa cagtatataa cacacaaatt caacagttac caataaaagc agctaaatta 1740
 tacttagagg caacaaaaac cttgctagga aacaccttca caaatgagga ctacacacta 1800
 gaatatcatg gaggactgta cagctcaata tggctatccc ctggtagatc ttactttgaa 1860
 acaacaggag catatacaga cataaagtac aatccattca cagacagagg agaaggcaac 1920
 atgttatgga tagactggct aagcaaaaaa aacatgaact atgacaaaagt acaaagtaaa 1980
 tgcttaatat cagacctacc tctatgggca gcagcatatg gatatgtaga attttgtgca 2040
 aaaagtacag gagacaaaaa catacacatg aatgccaggc tactaataag aagtcctttt 2100
 acagaccac aactactagt acacacagac cccacaaaag gctttgttcc ttactcttta 2160
 aactttggaa atggtaaaat gccaggaggt agtagtaatg tgcctattag aatgagagct 2220
 aatgggtatc caacattatt tcaccagcaa gaagtactag aggccttagc acagtcaggc 2280
 ccctttgcat accactcaga cattaaaaaa gtatctctgg gtatgaaata ccgttttaag 2340
 tggatctggg tgggaaaccc cgttcgcaa caggttgtta gaaatccctg caaagaaacc 2400
 cactcctcgg gcaatagagt ccctagaagc ttacaaatcg ttgaccgaa atacaactca 2460
 ccggaactca cattccatac ctgggacttc agacgtggcc tctttggccc gaaagctatt 2520
 cagagaatgc aacaacaacc aacaactact gacatttttt cagcaggccg caagagaccc 2580
 aggagggaca ccgaggtgta cactccagc caagaagggg agcaaaaaga aagcttactt 2640
 ttccccccag tcaagctcct cagacgagtc cccccgtggg aagactcgca gcaggaggaa 2700
 agcgggtcgc aaagctcaga ggaagagacg cagaccgtct cccagcagct caagcagcag 2760
 ctgcagcaac agcgaatcct gggagtcaaa ctcagactcc tgttcaacca agtcaaaaaa 2820
 atccaacaaa atcaagatat caaccctacc ttgttaccaa ggggggggga tctagcatcc 2880
 ttatttcaaa tagcaccata aacatgtttg gtgaccccaa accttacaac ccttccagta 2940
 atgactggaa agaggagtac gaggcctgta gaatatggga cagaccccc agaggcaacc 3000

ES 2 708 782 T3

taagagatac ccctttctac ccctgggccc ccaaggaaaa ccagtaccgt gtaaacttta 3060
aacttgatt ccaataaagc taggccgtgg gactttcact tgcggtgtc tgcttataaa 3120
agtaactaag cactccgagc gaagcgagga gtgcgaccct tgggggctca acgccttcgg 3180
agccgcgccc tacgccttcg gctgcgcccg gcacctcaga ccccgctcg tgctgacacg 3240
ctcgcgctg tcagaccact tcgggctcgc gggggtcggg aaatttacta aacagactcc 3300
gagttgccat tggactcagg agctatgaat cagtaacgaa agtgagtggg gccagacttc 3360
gccataaggc ctttatcttc ttgccattg tcagtaacag gggtcgcat agacttcggc 3420
ctccacttta ccttgtaaaa actaccaaaa tggccgttcc agtgacgtca cagccgccat 3480
ttaaagtagc tgacgtcaag gattgacgta aagggtaaag gtcacccctcg gcggaagcta 3540
cacaaaatgg tggacaacat cttccgggtc aaaggttggt cgtacgtcac aagtcacgtg 3600
gaggggaccc gctgtaaccc ggaagtaggc cccgtcacgt gacttaccac gtgtgtacac 3660
gtcaccgccc ccattttggt ttacaaaatg gctgacttcc ttctctttt ttgaaaaaag 3720
gcgcaaaaa accgtcggcg ggggggccgc gcgctgcgcg cgcggccccc ggggggaggc 3780
attgcctccc cccccgcgc gcatgcgccc gggcccccc cctccgggg ggctccgccc 3840
cccgccccc ccc 3853

<210> 2
<211> 3242
<212> ADN
<213> Torque teno midi virus 1

5

<400> 2

aggtggagac tcttaagcta tataaccaag tggggtggcg aatggctgag tttaccccg 60
tagacggtgc agggaccgga tcgagcgag cgaggaggc cccggctgcc cgtgggcggg 120
agcccagggt gagtgaaacc accgaggtct agggcaatt cgggctaggg cagtctagcg 180
gaacgggcaa gaaacttaaa aatatttctt ttacagatgc aaaacctatc agccaaagac 240
ttctacaaac catgcagata caactgtgaa actaaaaacc aaatgtgat gtctggcatt 300
gctgactccc atgacagttg gtgtgactgt gatactcctt ttgctcacct cctggctagt 360
atcttctctc ctggtcacac agatcgaca cgaacctacc aagaaatact taccagagat 420
tttagaaaa catgcctttc tgggtgggccc gacgcaacaa attctggtat ggccgaaact 480
atagaagaaa aaagagaaga tttccaaaa gaagaaaaag aagattttac agaagaacaa 540
aatatagaag acctgctcgc cgccgctcga gacgcagaag gaaggaaga agaaaaaaa 600
aaactcttat agtaagacaa tggcagccag actctattgt actctgtaaa attaaaggt 660
atgactctat aatatgggga gctgaaggca cacagtttca atgttctaca catgaaatgt 720
atgaatatac aagacaaaag taccctgggg gaggaggatt tgggtgtacaa ctttacagct 780

10

ES 2 708 782 T3

tagagtattt gtatgaccaa tggaaactta gaaataatat atggactaaa acaaatcaac	840
tcaaagattt gtgtagatac ttaaaatgtg ttatgacctt ttacagacac caacacatag	900
atthtghtaat tgtatatgaa agacaacccc catttgaaat agataaacta acatacatga	960
aatatcatcc atatatgtta ttacaaagaa agcataaaat aatthttacct agtcaaacia	1020
ctaactctag aggtaaatta aaaaaaaga aaactattaa acctcccaa caaatgctca	1080
gcaaatggtt ttttcaacia caatthgcta aatatgatct actacttatt gctgcagcag	1140
catgtagtht aagataacct agaataggct gctgcaatga aaatagaatg ataaccttat	1200
actgthttaa tactaaatth tatcaagata cagaatgggg aactacaaaa caggcccccc	1260
actactthta accatagca acaathtaata aatccatgat atthgtctct aactatggag	1320
gtaaaaaac agaatataac ataggccaat ggatagaaac agatatacct ggagaaggta	1380
atctagcaag atactacaga tcaataagta aagaaggagg thactthtca ctaaaatac	1440
tgcaagcata tcaaacaaaa gtaaagtctg tagactacia acctthacca atthgthtag	1500
gtagatataa cccagcaata gatgatggaa aaggcaacia aatthactta caaactataa	1560
tgaatggcca thggggccta cctcaaaaa caccagatta tataatagaa gaggtccctc	1620
thtggttagg cthctgggga tactataact actthaaaaa aacaagaact gaagctatat	1680
thcactaca catgthtthta gtgcaaaagca aatacattca aacaciaaa acagaaacac	1740
ctaacaatth thgggcattth atagacaaca gctthataca gggcaaaaac ccatgggact	1800
cagthattac thactcagaa caaaagctat ggtthcctac agthgcatgg caactaaaa	1860
ccataaatgc taththtgaa agthggacct atgtacctaa actagacaat caaacatata	1920
gtacctggga actagcaact cattactcat thcactthaa atggggthgt ccacagatat	1980
cagaccaacc agthgaagac ccaggaaca aaaaaciaa thgatgtgcc gatacaatca	2040
aagaagcatt acaaatthgt aaccagcaa aaacattgc thccacgatg thccatgact	2100
gggactacag acgggthtgc attacatcaa cagctattha aagaatgcaa caaacctcc	2160
caactgattc atctctogaa thtgattcag actcagaacc agcacccaag aaaaaagac	2220
tactaccagt cctccagcag ccacaaaaga aaacggaaaa gatcaaccaa thtctctct	2280
ctctctgca agaaagtaca thccaggagc aggaaacgga ggaaacatc thcaagctca	2340
thcagcagca gcagcagcag cagcagaaac thcaagcaaa cctcttagta ctaatcaagg	2400
actthaaagt gaaaciaaaga thattaciaac thaciaacggg ggtactagaa thacccttac	2460
cagaththaa ccaggatthg agcaagaaac thaaaaagag thagcacaag caththacag	2520
acccctaga ctgthcaaag aagataaac cththacccc thggtacca gaththacac	2580
cctthgtaac ththacctta atththaaagg ctaggcctac actgctcact thgtgthgta	2640
ththththaa agththgcacc ccagaaaaat thgthaaataa aaaaaaaaa aaaaaataaa	2700

ES 2 708 782 T3

	aaattgcaaa aattcggcgc tcgcgcgcgc tcgcgcgcgc agcgcctca cgcgcggcg	2760
	ctcgcgcgcc gcgcgtatgt gctaacacac cacgcacctt gattgggggtg cgcgcgtagc	2820
	gcgcgacccc caatgcgccc cgcctcgtt ccgacccgct tcgcggggtc ggaccacttc	2880
	gggctcgggg gggcgcgcct gcggcgctta ttactaaac agactccgag tcgccattgg	2940
	gcccccccta agctccgccc ccctcatgaa tattcataaa ggaaaccaca aaattagaat	3000
	tgccgaccac aaactgccat atgctaatta gttccccttt tacacagtaa aaaggggaag	3060
	tgggggggca gagccccccc acaccccccg cggggggggc agagcccccc ccgcaccccc	3120
	cctacgtcac aggccacgcc cccgccgcca tcttggtg gcagggcg ggactaaaaat	3180
	ggcgggaccc aatcatttta tactttcact ttccaattaa aaccgccac gtcacacaaa	3240
	ag	3242
	<210> 3	
	<211> 2915	
5	<212> ADN	
	<213> Torque teno mini virus 9	
	<220>	
10	<221> característica diversa	
	<222> (2865)..(2866)	
	<223> n es a, c, g, o t	
	<220>	
15	<221> característica diversa	
	<222> (2875)..(2876)	
	<223> n es a, c, g, o t	
	<220>	
20	<221> característica diversa	
	<222> (2893)..(2894)	
	<223> n es a, c, g, o t	
	<400> 3	
	taataaatat tcataaagga aaccgctaatt ttgaattgcc gaccacaaac tgacatatgc	60
	aaattaactt ctgcaattta ccttaacttc ctcaaaaatt aattaataat catcgtcaca	120
	gtgggaggag actctacact atataatcaa ctacacttcc gaatggctga gtttatgccg	180
	ccagacggag actggagcag ttcactgatt acaggctgac caagggcggg tgccgaaggt	240
	gagtgaacc accgaagtca aggggcaatt cgggctaggt cagtctggcg gaacgggcaa	300
	gaaacttaaa ataattttat tttacagaat gtcaagatat attccaacaa aatcaacact	360
	tagacaaaaa aaactacaat ggatgaatct aattgtgcac ggccacgaca tcttttgtga	420
	ctgctgcaaa ccacttgaat gcaccattgg aaccataatt aaccaagaac caaacctaaa	480
	atttaacaca gaagaaaaaa atctacttaa aaaatgcctt tctacaaaag atggagacgc	540
25	tggcgtggc gccgcagacc ccgacggctt tggagaagga gatttagacg ccctctttac	600

ES 2 708 782 T3

agaagatfff ggagaagaaa atacagggta agaaaaagaa aacttaaata cttaccctta	660
agacaatggc aacctcatta tattaacaaa ctaaaagtac aaggatggta cccactagca	720
atatcaacta aagacagact atcaataac ttaaacttat atttagaaag cattgcgccg	780
cattatftac atgggtgggg aggatftaca atatgtaact tttctftaat gactftatat	840
caagaaaacc ttgtatgtag aaactgggtg acaaaaggaa atgaaaatat gcctftaatt	900
agatacctag gatgtgaaat tacctftatat agacaagctg aagtagacta catggtatat	960
gtacataatt cttatcctat gtcagctaat ttattaacat atcaaagtac atgcccacaa	1020
gftatgctta tgaacaatag aacaaaaata atgccttgta aaagatataa tagaaacaaa	1080
aaacctftaca aaaaattcct tgtaaaacca cctftctcaat tacaaaacaa atggtactftt	1140
caaaaggaaac tatctaacgt tccactftatg caagfttatgg ctacaacttg ctcgfttagac	1200
cgcatgtacc tftcctcatc atcagftftca accacaatgg gftfttgaag cfttagatact	1260
aacggtftca tggaaagata tatgaaagac aatggaacag caccatactc cccattaaaca	1320
ggacaaaataa tftftgctgc accaaacggft gacaatgtaa taacaaatat acccctagga	1380
caatgcatat tattaggaac agtaacagac tatacaccag gaaccaact tftcatccata	1440
accttaaata cgggtgcact cagftcccct tcagatftggg gaacctftaa gtcagcatct	1500
aaagcaatft ataatgcata ctatcaacac aaatattggg gaaatccatt tfttacaac	1560
tggftccatg gtgaccaaag aatgatagct acaggcaaaa ccttaaaaga actfttgtcaa	1620
atatacaaag atgacgatat aaccacagct aaactaaaag aaggctfttat atttaagaa	1680
caaaagtggg tagaactcag atacaacca tgggcagata aaggaaaagg taatatggta	1740
tatttattac ccattaatga acatcaacac tcttatggct gggcaccacc aacaaacaaa	1800
gatataataa cacaagatct acccctcaac atattactgt ggggatacct agatftftcac	1860
agaaaagcaa aaacatacaa tgacatagac acaacatgft tactagftcat aaaatctcct	1920
tacctatatc caaaaggaca aattactftt gctgftcctt tagatcaaga attfttagat	1980
ggtaactcac catactfttac tgaaggftcac aaaacacaat cagaccaaca atattggcat	2040
ccaaaagtaa gatftcaaac tagaacgftt aatgcatag catgtacagg cccaggaaca	2100
acaaaattac caccagatgt tagtactgaa tftcatatga aatataaatt tcgftfttaag	2160
attggaggag aaccagcacc catgftctgta ctcaaaaacc cagatgaaca accaacctat	2220
accatcccca ataacctcct acaaaact tcgftgcaga gtccaacaac accatftgaa	2280
tacctcctct ggaactftga cgaacgcaga ggagagctta caaaaagagc tgcaaaaaga	2340
attactcaaa acatccaaac tgaacaaat gftftgcaa ttacagagft agcagcctgg	2400
tgtccagcaa cacaccgaaa aacacaagac ccatcggaga catcgacctc ggaagaagac	2460

ES 2 708 782 T3

	gaaacactca cgacggagga gaaactactc cagcagcgaa gagagcaaaa actcctccac	2520
	aaactcatca gacgacagtt actcagacta accacatcag aataaagaca ttaaagtgtt	2580
	ctatgtttgc agatactccc actcceaata ggagaatgac tacctgggaa tatgagcaag	2640
	agtttagagga tgctaaaata tgggtgtagag tacctagaac atatatacat gatcacccaa	2700
	cctatccctg ggtcccagaa gtacctaaat atactgtaa ctttgactta aacgcgccgc	2760
	aataaactca aggcctgcaa aatttcactc tcggtgtcca tttatataag tttaaacctt	2820
	aataaacatc caccacactc ccaaatacgc aggcgcagag ggggnnccgc ccccnagac	2880
	ccccaggggg ggnnaagccc cccctcaaac ccccc	2915
5	<210> 4 <211> 36 <212> ADN <213> artificial	
10	<220> <223> cebador <400> 4	
	ascgvagtca aggggcmwwt cgggcdsgsk sggtra	36
15	<210> 5 <211> 33 <212> ADN <213> artificial	
20	<220> <223> cebador <400> 5	
25	gaatggywga gtttywcbhc gccsgtysgy rga	33
30	<210> 6 <211> 15 <212> ADN <213> artificial <220> <223> cebador	
35	<400> 6 cgaatggctg agttt	15
40	<210> 7 <211> 12 <212> ADN <213> artificial <220> <223> cebador	
45	<400> 7	
50	gggcgggtgc cg	12

REIVINDICACIONES

1. Método para caracterizar el estado inmunosuprimido o no inmunosuprimido de un sujeto, que comprende las etapas siguientes:
- 5 a. determinar la carga anelovírica a partir de una muestra biológica de dicho sujeto, y
- b. determinar a partir de la comparación de la etapa a) el estado inmunosuprimido o no inmunosuprimido.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que la carga anelovírica se determina midiendo el nivel de ADN de anelovirus.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el nivel de ADN de anelovirus se mide mediante hibridación con una sonda marcada, amplificación por PCR o secuenciación.
- 15 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el nivel de ADN de anelovirus se mide secuenciando dicho ADN de anelovirus.
5. Método según la reivindicación 4, que es un método de secuenciación cuantitativo que usa unos cebadores de secuencias representadas mediante SEC ID No 4 y 5.
- 20 6. Método según la reivindicación 4 o 5, en el que dichos cebadores además comprenden por lo menos uno de entre:
- 25 - un grupo funcional para el acoplamiento covalente en el extremo 5' o 3', tal como un grupo terminal que comprende un grupo tiólico, amínico o carboxílico,
- una molécula o secuencia espaciadora en el extremo 5' o 3',
- 30 - unas secuencias adicionales como secuencias índice o de etiqueta para llevar a cabo etapas de pre y posamplificación adicionales y generales que no dependen de las secuencias diana que se deben cuantificar.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el nivel de ADN de anelovirus se mide mediante secuenciación masiva en paralelo.
- 35 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la determinación de la carga anelovírica incluye la etapa de medir el número de secuencias anelovíricas en dicha muestra biológica.
- 40 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la determinación de la carga anelovírica además incluye la etapa de calcular la relación de secuencias anelovíricas con respecto al número total de secuencias presentes en dicha muestra biológica.
- 45 10. Método según la reivindicación 9, en el que el sujeto está inmunosuprimido si dicha relación es mayor que 0.2×10^{-4} .
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la determinación de la carga anelovírica además incluye las etapas de asignar cada secuencia de anelovirus a un genoma de anelovirus específico y numerar las copias de los genomas de anelovirus identificados de este modo.
- 50 12. Método según la reivindicación 11, en el que la determinación de la carga anelovírica además incluye la etapa de normalizar el número de genomas de anelovirus con respecto a por lo menos una secuencia humana o no humana.
- 55 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la carga anelovírica se determina mediante PCR cuantitativa.
14. Método según la reivindicación 13, en el que la determinación de la carga anelovírica incluye la amplificación de por lo menos una secuencia de anelovirus de consenso.
- 60 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, en el que la determinación de la carga anelovírica incluye la amplificación de cualquier secuencia anelovírica comprendida entre las secuencias de consenso representadas por SEC ID No. 4 y SEC ID No. 5.
- 65 16. Método para diseñar un tratamiento de inmunomodulación para un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas siguientes:

- a. determinar a partir de una muestra biológica de un sujeto el estado inmunosuprimido o no inmunosuprimido mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, y
- 5 b. diseñar el tratamiento de inmunomodulación según dicho estado inmunosuprimido o no inmunosuprimido determinado en la etapa a).
17. Fármaco inmunomodulador para su uso en el tratamiento de una afección asociada con inmunodeficiencia en un sujeto, en el que el uso comprende las etapas siguientes:
- 10 a. determinar el estado inmunosuprimido o no inmunosuprimido de dicho sujeto mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, y
- b. adaptar dicho tratamiento de inmunomodulación a dicho sujeto,
- 15 y en el que
- dicho fármaco inmunomodulador es un fármaco inmunosupresor seleccionado de entre la lista que consiste en glucocorticoides, fármacos antiproliferativos y antimetabólicos, preferentemente rapamicina, everolimus, micofenolato mofetilo, ácido micofenólico; inhibidores de calcineurina, preferentemente ciclosporina, FK506, voclosporina; agonistas de S1P-R, preferentemente FTY720; malononitrilamidas, preferentemente FK7778; y anticuerpos (por ejemplo, globulina antitimocítica), incluyendo anticuerpos monoclonales (por ejemplo, muromonab-CD3, daclizumab, basiliximab, rituximab, alemtuzumab, infliximab, adalimumab, efalizumab); o
 - dicho fármaco inmunomodulador es un fármaco inmunoestimulante seleccionado de entre la lista que consiste en pequeñas moléculas sintéticas, preferentemente poli I:C, levamisol, inosina pranobex; microorganismos vivos, preferentemente *Corynebacterium parvum*; mezclas complejas de componentes bacterianos con aceites minerales, preferentemente adyuvante de Freund, o sales inorgánicas, preferentemente hidróxido/fosfato de aluminio y magnesio; proteínas recombinantes que modulan la inmunidad (por ejemplo, citocinas, anticuerpos contra receptores celulares); tratamientos antivirales, incluyendo oseltamivir, zanamivir, interferón, particularmente alfa-interferón.
18. Fármaco inmunomodulador para su uso según la reivindicación 17, en el que la afección asociada con inmunodeficiencia es un rechazo de trasplante.
19. Fármaco inmunomodulador para su uso según la reivindicación 17, en el que la afección asociada con inmunodeficiencia es una infección.
20. Cebador que consiste en una secuencia representada por SEC ID No. 4.
21. Cebador que consiste en una secuencia representada por SEC ID No. 5.
22. Cebador según cualquiera de las reivindicaciones 20 y 21, en el que dicho cebador está en disolución.
23. Cebador según cualquiera de las reivindicaciones 20 y 21, en el que dicho cebador está enlazado a un soporte sólido.
24. Cebador según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 21, en el que dicho cebador está marcado con un marcador radioactivo, un marcador fluorescente o un marcador químico.