

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 230**

51 Int. Cl.:

C07K 16/08 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2013 PCT/IB2013/055257**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2014 WO14002035**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2013 E 13785909 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2867257**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal humano contra la proteína VP1 del virus JC**

30 Prioridad:

27.06.2012 IT TO20120570

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

20.06.2018

73 Titular/es:

**POMONA RICERCA S.R.L. (100.0%)
Via Ottavio Assarotti 7
10122 Torino , IT**

72 Inventor/es:

**BURIONI, ROBERTO y
CLEMENTI, MASSIMO**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 673 230 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

Anticuerpo monoclonal humano contra la proteína VP1 del virus JC

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la inmunología y particularmente el campo de los anticuerpos neutralizantes dirigidos contra antígenos de patógenos virales.

Más específicamente, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína VP1 del virus JC (VJC).

10 El virus JC (VJC) es un poliomavirus humano de la familia *Polyomaviridae* y el agente responsable de una enfermedad desmielinizante extremadamente grave, a menudo mortal, designada como leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML). El virus JC tiene una cápside icosaédrica sin envoltura que confina un genoma circular de doble hebra de ADN. El principal componente de la cápside es la proteína viral VP1. Estudios estructurales
15 hechos en viriones revelaron que la cápside de poliomavirus está compuesta por 72 pentámeros formados por monómeros de VP1 unidos a través del extremo C terminal. VP1 se une a los receptores en las células diana y de ese modo inicia la infección.

20 El virus JC infecta a más del 85% de humanos adultos. Después de la infección primaria, el virus JC permanece quiescente en los riñones y órganos linfoides. En individuos sanos, este virus puede replicarse en las células tubulares renales y se excreta en la orina, sin ocasionar enfermedad alguna. Sin embargo, en casos de inmunodepresión grave, en sujetos que recibieron un trasplante de órganos, en pacientes oncológicos, en pacientes tratados con las novedosas terapias inmunomoduladoras basadas en anticuerpos monoclonales, o en personas que padecen SIDA, el virus JC puede diseminarse al sistema nervioso central y provocar leucoencefalopatía multifocal
25 progresiva (PML). En la era anterior a cART (terapia antirretroviral combinada), la incidencia de PML en pacientes de VIH oscilaba entre el 0,3% y el 8%, pero el uso extensivo de tratamientos antirretrovirales determinó una disminución significativa de la misma. La infección por VIH es la causa de inmunodeficiencia todavía más frecuentemente asociada a PML, con aproximadamente el 80% de los casos, seguida por tumores hematológicos (aproximadamente el 8%), tumores sólidos (aproximadamente el 3%), trasplantes de órganos y enfermedades autoinmunitarias tratadas
30 con inmunomoduladores.

Sin embargo, en los últimos diez años, se notificaron cifras crecientes de casos de PML no correlacionados con VIH/SIDA. Muchos de estos nuevos casos se producen en individuos sometidos a inmunoterapias con fármacos recientemente disponibles. Hasta el 29 de febrero de 2012, se han documentado 212 casos de PML relacionados
35 con el tratamiento con natalizumab, con respecto a 99571 pacientes que padecen esclerosis múltiple tratados en todo el mundo con este fármaco. La PML también se ha correlacionado con otras terapias inmunomoduladoras, incluyendo efalizumab, micofenolato mofetilo y rituximab.

40 Para el tratamiento de PML, se han intentado varias estrategias terapéuticas, que se dirigieron contra diferentes fases del ciclo de replicación viral, tales como, por ejemplo, entrada en la célula diana y replicación del genoma. Sin embargo, ninguna de ellas dio efectos beneficiosos significativos. Basándose en una conexión entre PML y estados de inmunodepresión graves, también se intentaron enfoques inmunológicos. Por ejemplo, se mostró que los pacientes que padecen PML con un pronóstico más favorable se caracterizan por una respuesta mediada por células y humoral específica de VJC más fuerte. La importancia potencial de una respuesta específica anti-JCV,
45 particularmente contra VP1, se confirmó por la fuerte actividad neutralizante de sueros de animales (conejo) inmunizados con la proteína VP1 de VJC (Goldmann C *et al.* Journal of Virology, mayo de 1999, páginas 4465-4469).

50 Una terapia alternativa basada en anticuerpos anti-JCV podría aplicarse por tanto al tratamiento de pacientes que padecen PML. Particularmente, en vista del papel clave de la proteína VP1 en las fases tempranas de la infección por VJC, los mejores candidatos podrían ser anticuerpos contra la proteína VP1 de VJC.

Tal necesidad la han satisfecho ahora los presentes inventores que, por primera vez, tuvieron éxito en obtener anticuerpos monoclonales completamente humanos dirigidos hacia la proteína VP1 de VJC, y que tienen una actividad neutralizante contra el virus, lo que los hace adecuados para su uso en el tratamiento terapéutico de la
55 PML.

60 Estos resultados deben considerarse nuevos y sorprendentes en vista del estado de la técnica, dado que no se ha descrito hasta ahora ningún anticuerpo monoclonal humano anti-VP1 de VJC, y mucho menos un anticuerpo monoclonal neutralizante humano anti-VP1 de VJC.

Goldmann C *et al.*, citado anteriormente, describieron sueros hiperinmunes con anticuerpos anti-VP1 de conejo generados por partículas similares a virus que tienen propiedades neutralizantes contra VJC.

65 La solicitud de patente japonesa JP9067397A mencionó un método para obtener un anticuerpo anti-JCV neutralizante, que comprende inmunizar ratas con un péptido sintético correspondiente a una porción de la proteína

VP1, recoger los sueros inmunitarios a partir de las ratas y separar una fracción de gammaglobulinas. En esta patente, la selección de un anticuerpo monoclonal no se mencionó, y mucho menos uno derivado del hombre.

5 El anticuerpo monoclonal anti-VP1 de VJC, designado como ab34756, comercializado por Abcam®, Reino Unido, es un anticuerpo murino usado para detectar el virus a través de ELISA e inmunotransferencia de tipo Western, claramente no adecuado para aplicaciones terapéuticas, y mucho menos en el ser humano.

10 Youssef Lyla *et al.*, Journal of Neurovirology, vol. 18, n.º de supl. 1, mayo de 2012, página 125, dan a conocer un anticuerpo monoclonal murino anti-VP1 de JCV y la eficacia terapéutica potencial de su versión humanizada.

Por tanto, ninguno de los anticuerpos anti-JCV de la técnica anterior sería potencialmente adecuado para usarse en aplicaciones terapéuticas o profilácticas para infecciones por VJC o enfermedades correlacionadas con las mismas en pacientes humanos.

15 También debe indicarse que, antes de las pruebas realizadas por los presentes inventores, el experto en la técnica no habría esperado razonablemente obtener anticuerpos monoclonales anti-JCV completamente humanos que pudieran neutralizar el virus JC, dado que no había ninguna publicación científica disponible en donde la presencia de anticuerpos anti-JCV neutralizantes se hubiera evaluado con precisión en la respuesta humoral humana. A modo de ejemplo, se menciona el artículo de G. Bloomgren *et al.* N Engl J Med 2012; 366: 1870-80, en donde los autores proponen una estratificación del riesgo de PML en pacientes que padecen esclerosis múltiple. Para la estratificación del riesgo, los autores proponen tres factores de riesgo, es decir, la presencia o ausencia de anticuerpos anti-JCV, el uso previo de inmunodepresores y la duración del tratamiento con natalizumab, pero no proponen o mencionan de ninguna manera la evaluación de la presencia de anticuerpos neutralizantes en la respuesta humoral humana. Por otro lado, la técnica anterior indica los problemas técnicos relacionados con la detección de la respuesta humoral anti-JCV en el ser humano, por ejemplo, en Raphael P. Viscidi y Barbara Clayman, Advances in experimental medicine and biology 2006; 577(): 73-84 y en Wendy A. Knowles, Advances in experimental medicine and biology 2006; 577(): 19-45.

30 Por tanto, un primer objeto de la presente invención es un anticuerpo monoclonal humano neutralizante contra la proteína VP1 del virus JC, tal como se define en la reivindicación 1 adjunta.

Dentro del alcance de la presente descripción, el término “anticuerpo monoclonal” pretende significar cualquier estructura peptídica que puede unirse al antígeno, en este caso la proteína VP1 de VJC. Este término incluye por tanto inmunoglobulinas de longitud completa y fragmentos de inmunoglobulinas funcionales, que comprenden generalmente un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, pero también pueden comprender un solo dominio variable. Ejemplos específicos, pero no limitativos, de fragmentos de inmunoglobulinas funcionales son los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, anticuerpos de cadena sencilla (scFv) y anticuerpos de un solo dominio. Los anticuerpos de cadena sencilla, por ejemplo, se construyen según el método descrito en la patente US 4.946.778 concedida a Ladner *et al.* Los anticuerpos de cadena sencilla comprenden las regiones variables de cadenas ligeras y pesadas, unidas a través de un resto de unión flexible (ligador). El fragmento de anticuerpo designado como anticuerpo de un solo dominio incluso es más pequeño que el anticuerpo de cadena sencilla, dado que comprende un solo dominio VH aislado. Las técnicas para obtener anticuerpos de un solo dominio con al menos parcialmente la misma capacidad de unión que el anticuerpo de longitud completa, se describen en la técnica anterior y se encuentran dentro de la habilidad del experto en la técnica. Ward, *et al.*, en “Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted from *Escherichia coli*”, Nature 341: 544-6, describen un método de examen para obtener una región variable de cadena pesada de anticuerpo (anticuerpo de un solo dominio VH) que tiene una afinidad por el epítipo diana suficientemente fuerte para unirse al mismo en forma aislada.

50 El término “inmunoglobulina”, tal como se usa en la presente descripción, comprende IgG (incluyendo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgA, IgM, IgD e IgE, en forma tanto monomérica como polimérica.

55 El término “neutralizar” o significa que el anticuerpo monoclonal, objeto de la invención, puede bloquear el ciclo de replicación viral de JC en una de sus fases, afectando de ese modo a su actividad biológica y al menos una de las enfermedades asociadas con el mismo.

Los inventores observaron que el anticuerpo monoclonal anti-JCV de la invención puede unirse a un epítipo de conformación de la proteína VP1 de VJC, que comprende al menos un residuo de aminoácido de la secuencia primaria de la proteína VP1 de VJC, seleccionado del grupo que consiste en I62, S65, A127, D130, N131, A133 y A175, o cualquier combinación de los mismos. En una realización más específica, el epítipo de conformación comprende los residuos de aminoácido I62, S65, A127, D130, N131, A133 y A175 de la secuencia primaria de la proteína VP1 de VJC.

65 La numeración de los residuos de aminoácido se basa en la numeración de la secuencia de aminoácidos de la proteína VP1 de la cepa Mad1 (SEQ ID NO: 7). La SEQ ID NO: 7 está disponible en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot (ID de Swiss: P03089 identificador de característica: PRO_0000115021). Sin embargo, el

epítopo de conformación no se encuentra dentro de la invención reivindicada.

El término "epítopo de conformación" pretende significar todos los residuos de aminoácido, incluso si no son contiguos en la secuencia primaria de la proteína, que están implicados directamente en la unión con el anticuerpo o, si se mutan de mono que no cambia la conformación general de la proteína, afectan de todas formas a la afinidad de unión del propio anticuerpo.

El anticuerpo monoclonal de la invención comprende al menos un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, en donde el dominio variable de cadena pesada tiene la secuencia SEQ ID NO: 1 (o está codificado por la secuencia SEQ ID NO: 3) y el dominio variable de cadena ligera tiene la secuencia SEQ ID NO: 2 (o está codificado por la secuencia SEQ ID NO: 4). Tal anticuerpo monoclonal específico también se denomina GRE1.

Otro aspecto de la presente invención es un anticuerpo monoclonal humano dirigido contra la proteína VP1 del virus JVC, tal como se definió anterioremente, para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico de una infección por VJC o una enfermedad asociada con una infección por VJC, preferiblemente la leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML).

La identificación de la dosis eficaz y la formulación del anticuerpo monoclonal de la invención para dar una composición farmacéutica adecuada para su uso dentro del alcance de la presente invención están dentro de las habilidades del experto en la técnica, sin esfuerzos inventivos excesivos.

El anticuerpo monoclonal de la presente invención también es adecuado para usarse en el campo del diagnóstico, dado que se caracteriza por una alta sensibilidad y especificidad. Este anticuerpo monoclonal mostró una alta afinidad (aproximadamente 1 nM) por VP1 recombinante de la cepa Mad1 y, a la misma concentración que un anticuerpo murino comercial (Abcam[®]), muestra una señal altamente mejorada por ELISA. Aun cuando se evaluó por un ensayo de inmunofluorescencia realizado en células COS-7 infectadas con VJC (cepa Mad4), el anticuerpo mostró sensibilidad y especificidad superiores en comparación con el anticuerpo comercial Abcam[®]. Además, es importante indicar que el anticuerpo monoclonal de la presente invención no mostró reactividad hacia VP1 de BKV recombinante (virus que pertenece a la familia *Polyomaviridae* como el VJC; las VP1 de VJC y BKV presentan aproximadamente el 75% de homología de secuencia de nucleótidos) por ELISA, indicando de ese modo su alta especificidad únicamente por VP1 de VJC.

Por tanto, un método de diagnóstico *in vitro* y el kit relevante para el diagnóstico de una infección por VJC, en el que el anticuerpo monoclonal de la presente invención se usa como reactivo de diagnóstico específico de VJC, se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

El método de inmunodiagnóstico *in vitro* comprende la etapa de poner en contacto una muestra biológica de un paciente que se sospecha que está infectado por VJC con el anticuerpo monoclonal de la invención, en condiciones adecuadas para que el anticuerpo monoclonal de la invención se una al antígeno VP1 de VJC, si está presente en la muestra, y la etapa de detectar cualitativa y cuantitativamente la unión entre el anticuerpo monoclonal de la invención y el antígeno VP1 de VJC.

El método de inmunodiagnóstico de la invención se lleva a cabo, por ejemplo, como ensayo inmunoenzimático de ELISA o como ensayo de inmunofluorescencia. La muestra sobre la que se realiza el ensayo es, por ejemplo, una muestra de sangre, plasma, suero, orina, líquido cefalorraquídeo, biopsia o cualquier otra muestra biológica considerada adecuada.

El kit de inmunodiagnóstico para llevar a cabo el método comprende el anticuerpo monoclonal de la invención, como reactivo específico, e instrucciones para realizar el ensayo, así como eventualmente otros componentes que variarán dependiendo del tipo de ensayo, y los conoce *per se* el experto en la técnica. Ejemplos de componentes adicionales que pueden estar contenidos opcionalmente en el kit son medios para la detección cualitativa y/o cuantitativa de la unión satisfactoria entre anticuerpo y antígeno, uno o más soportes sólidos (tales como, por ejemplo, placas de microtitulación), una disolución de blanco, una o más disoluciones patrón que contienen cantidades conocidas del antígeno de interés, disoluciones de control, disoluciones de dilución de la muestra que va a someterse a prueba, un anticuerpo de detección conjugado con un marcador detectable (por ejemplo, una molécula fluorescente) o con una enzima que puede reaccionar con un sustrato formando un producto detectable, disoluciones de lavado tampón, disoluciones que contienen el sustrato enzimático, disoluciones de detención, etc.

El método y kit de la invención pueden usarse de manera útil para estratificar el riesgo de desarrollar PML en pacientes con diversas condiciones de predisposición.

Los ejemplos que siguen ilustran la identificación y caracterización de un anticuerpo monoclonal neutralizante humano de la presente invención, así como la caracterización del epítopo reconocido por dicho anticuerpo, aunque el epítopo de conformación no se encuentra dentro de la invención reivindicada. El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1

5 Se construyó una biblioteca combinatoria de presentación en fagos de fragmentos de anticuerpos humanos (Fab monovalentes), del isotipo IgG1/k y con un tamaño estimado de 2×10^7 elementos, en el vector de fagémido pPD a través de métodos similares a los descritos previamente (Plaisant, P., *et al.*, Human monoclonal recombinant Fabs specific for HCV antigens obtained by repertoire cloning in phage display combinatorial vectors. *Res Virol*, 1997. 148(2): págs. 165-9). Se generó la biblioteca a partir de la médula ósea de un hombre de 68 años cuyo suero dio positivo para la presencia de anticuerpos anti-VP1/VJC por ELISA. Se realizó el ELISA recubriendo una placa de 96 pocillos con 100 ng/pocillo de proteína VP1 de VJC recombinante (Mad1, Abcam[®]) en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se añadieron varias diluciones de sueros por duplicado a una placa recubierta con VP1. Se incubó la placa a 37°C durante 1 hora y luego se lavó con PBS/TWEEN 20 al 0,1%. Se detectaron los anticuerpos unidos con un anticuerpo anti-IgG1 humana conjugado con peroxidasa (HRP) (Sigma-Aldrich[®]).

15 Se llevó a cabo el biocribado de la biblioteca combinatoria de anticuerpos de expresión en fagos para seleccionar el anticuerpo anti-VP1 tal como se describió anteriormente (Williamson, R.A., *et al.*, Human monoclonal antibodies against a plethora of viral pathogens from single combinatorial libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(9): págs. 4141-5). Brevemente, se usó una preparación de fagos (0,1 ml/pocillo), a una concentración de 10^{12} fagos por mililitro, se utilizó en cada uno de los ciclos de biocribado para seleccionar el anticuerpo en placas de ELISA de unión elevada (Costar[®]) recubiertas con VP1 de la cepa Mad1. Se llevó a cabo un total de 5 ciclos de biocribado y los fagos obtenidos de los últimos 3 ciclos se convirtieron a un sistema de fagémidos que expresan Fab solubles.

25 Se usaron células de *Escherichia coli* de la cepa XL-1-blue (Agilent Technologies[®]), transformadas con un vector de expresión de Fab, para producir las moléculas Fab seleccionadas para su caracterización adicional. Brevemente, se obtuvieron preparaciones de Fab por procedimientos de congelación-descongelación a partir de un cultivo. Se inocularon cinco ml de SB (súper caldo) que contenía ampicilina (50 µg/ml; Sigma-Aldrich[®]) con las bacterias transformadas y se hicieron crecer durante 7 horas a 37°C en un agitador giratorio. Se añadió isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG, 1 mmol/l; Sigma-Aldrich[®]) a las bacterias en crecimiento, que se incubaron adicionalmente durante la noche a 30°C. Entonces, se centrifugaron las células, se resuspendieron en 1 ml de PBS/albumina sérica bovina (BSA) al 1%, y se sometieron a un procedimiento de congelación-descongelación (3 rondas). Se redujeron los residuos celulares a un sedimento por centrifugación a 13000 g a temperatura ambiente en una microcentrífuga, y se utilizó el sobrenadante en un ensayo ELISA sin procesamiento adicional. El ELISA se realizó tal como se describió anteriormente.

35 Los clones que produjeron $DO_{450} > 0,8$ por ELISA contra VP1 de VJC se consideraron positivos y se caracterizaron adicionalmente.

Se analizaron 105 clones y 11 clones dieron positivo (10,5%). No se demostró reactividad contra BSA.

40 Con el fin de confirmar la especificidad de los clones positivos por ELISA, se sometieron a prueba estos mediante un ensayo de inmunofluorescencia en células COS-7 (células transformadas de fibroblastos renales de mono verde africano) infectadas con la cepa Mad4 de VJC (la proteína VP1 recombinante de la cepa Mad1 se usó en el ELISA). Se usó un antisuero de cabra anti-Fab humano conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich[®]) como anticuerpo secundario. Se confirmó que todos los clones positivos sometidos a prueba por ELISA podían unirse a las células infectadas, mientras que no se detectó reactividad con células sin infectar. Los clones negativos sometidos a prueba por ELISA no pudieron unirse a células infectadas.

50 El ácido nucleico de los clones positivos sometidos a prueba por ELISA se obtuvo con el kit Spin Miniprep (Qiagen[®]) y se secuenció en un secuenciador 373A (PerkinElmer[®]). Para secuenciar la cadena pesada, se usó el cebador SEQGz (5'-GTCGTTGACCGAGCCAG-3') (SEQ ID NO: 5), que se une a la hebra (+). Para la cadena ligera, se usó el cebador SEQKb (5'-ATAGAAGTTGTTTCAGGCA-3') (SEQ ID NO: 6), que se une a la hebra (+). El análisis de secuencias se llevó a cabo con las herramientas BLAST e IMGT y mostró que todos los clones se derivan de la misma subfamilia de genes VH para la cadena pesada, y genes Vk para la cadena ligera, y comparten la misma secuencia. Adicionalmente, la secuencia de ADN del anticuerpo es nueva. También es importante destacar que, en la bibliografía, no se ha descrito hasta ahora un anticuerpo humano que se dirija contra la proteína VP1 de VJC. Por tanto, este es el primer anticuerpo monoclonal humano anti-VP1 de VJC que se describe. Este anticuerpo se ha identificado por el nombre GRE1.

60 Con el fin de someter a prueba la actividad neutralizante del anticuerpo humano GRE1 anti-VP1, se sembraron células COS-7 a 5×10^4 /pocillo en medio DMEM completo en una placa de 24 pocillos (Corning[®]). Las células COS-7 son permisivas para la infección por VJC.

65 El día siguiente, se añadieron aproximadamente 100 unidades formadoras de focos de VJC (cepa Mad4) a 100 µl de diluciones progresivas de GRE1 (diluciones dobles, desde aproximadamente 20 µg/ml hasta 0,3 µg/ml). Se incubó la mezcla durante 1 hora a 37°C y luego se añadió a las células COS-7. Posteriormente, se incubaron durante 2 horas

a 37°C. Después de un lavado con PBS, se añadieron 500 µl de medio nuevo a cada pocillo y se incubaron las células durante 6 días a 37°C.

Evaluación de la actividad neutralizante

5 Se evaluó la actividad neutralizante de los anticuerpos por inmunofluorescencia. Brevemente, se llevó a cabo la inmunofluorescencia a los 6 días tras la infección. Se prepararon portaobjetos fijando las células durante 15 min con una mezcla de metanol/acetona (razón 1:1) a temperatura ambiente y usando el anticuerpo anti-VP1 murino comercial Abcam® (1 µg/ml) como anticuerpo primario, y el anticuerpo anti-Fab murino conjugado con FITC (Sigma-Aldrich®) como anticuerpo secundario, siguiendo las directrices del fabricante.

La evaluación se realiza comparando las cifras de células positivas en los pocillos en los que se añadió el virus a GRE1, con células infectadas en ausencia del anticuerpo (100% de infección).

15 Los datos observados bajo el microscopio de fluorescencia también se confirmaron por un sistema robotizado de lectura de fluorescencia (IN Cell Analyzer Sistem 1000, GE Healthcare) que puede distinguir automáticamente las células positivas del fondo, lo que indicó que el anticuerpo, como fragmento Fab, podía inhibir en más de un 50% la infección por VJC a una concentración de 1 ng/µl.

20 Experimentos análogos también han demostrado experimentalmente que no todos los sueros de pacientes reactivos contra VP1 de VJC pueden neutralizar el virus.

25 Para ese fin, se sometieron a prueba aproximadamente 100 sueros por ELISA a una dilución 1:400 (dilución en PBS/BSA al 1%) para verificar la presencia de anticuerpos anti-JCV. En resumen, se cubrió la placa de ELISA (Costar®) con 25 µl/pocillo de una solución que contenía 100 ng de VP1 recombinante (Abcam®) y se incubó a 4°C durante la noche. El día siguiente, se lavó la placa con agua y se bloqueó con PBS-BSA al 1% (p/v) durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se añadieron 40 µl de una sola dilución (1:400 en PBS/BSA al 1%) del suero que iba a someterse a prueba y entonces se incubó la placa durante 1 hora a 37°C. Después de haber hecho 5 lavados con PBS-Tween 20 al 0,1% (Sigma-Aldrich®), mediante un lavador automático para microplacas de ELISA (ETI-System Kasher, DiaSorin), se añadieron 40 µl/pocillo del anticuerpo comercial anti-IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich®), siguiendo las indicaciones del fabricante. La placa se incubó entonces durante 45 minutos a 37°C. Después de haber hecho varios lavados, tal como se describió anteriormente, se añadieron 40 µl de sustrato (solución 1:1 de H₂O₂ y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, kit de sustrato TMB, Thermo Scientific) a cada pocillo, para que se produjera la reacción enzimática. Después de aproximadamente 15 minutos, se bloqueó la actividad enzimática añadiendo 40 µl/pocillo de H₂SO₄ 1 N (Carlo Erba) y se midió la reacción colorimétrica con un espectrofotómetro (Model 680 Microplate Reader, Bio-Rad) a una longitud de onda de 450 nm.

35 Se introdujo antígeno BSA, u otro antígeno adecuado, en cada experimento como control negativo, cuya D.O.₄₅₀ se utilizó para detectar una posible reactividad inespecífica.

40 Unos cuantos sueros, que mostraron reactividad contra VP1 de VJC > 1 D.O. 450, se analizaron con un ensayo de neutralización. Brevemente, el día antes de la infección, se sembraron células COS-7 (permisivas para la infección por VJC) a 5 x 10⁴/pocillo en medio DMEM completo en una placa de 24 pocillos (Corning®). El día siguiente, se añadieron 200 µl del medio que contenía VJC (Mad1) a 200 µl de la dilución 1:200 del suero que iba a someterse a prueba (la dilución final del suero entonces es 1:400, el misma dilución usada para el ensayo ELISA). Se incubó la mezcla durante 1 hora a 37°C y luego se añadió a las células COS7. Posteriormente, se incubaron por 2 horas a 37°C. Después de un lavado con PBS, se añadieron 500 µl de medio nuevo a cada pocillo y se incubaron las células durante 6 días a 37°C.

50 Se evaluó la actividad neutralizante de las muestras sometidas a prueba por inmunofluorescencia indirecta. Se prepararon los portaobjetos fijando las células por 15 min con una mezcla metanol/acetona (razón 1:1) a temperatura ambiente y utilizando el anticuerpo anti-VP1 murino comercial Abcam® (1 µg/ml) como anticuerpo primario, y el anticuerpo anti-IgG murino conjugado con FITC (Sigma-Aldrich®) como anticuerpo secundario, siguiendo las directrices proporcionadas por el fabricante.

55 Se realizó la evaluación comparando las cifras de células positivas en los pocillos en los que se añadió el virus a la muestra sometida a prueba, con células infectadas en ausencia de la muestra (100% de infección).

60 Este análisis demostró que, a pesar de la reactividad hacia VP1 por ELISA, un número no insignificante de sueros no mostró actividad anti-JCV neutralizante. Los resultados obtenidos se ilustran en la gráfica en la figura 1. En la gráfica de la figura 1, se notifican los porcentajes de la actividad neutralizante de algunos de los sueros sometidos a prueba. Todos los sueros sometidos a prueba demostraron, por ELISA, una reactividad > 1 D.O.450 hacia VP1.

Inmunofluorescencia e inmunohistoquímica en muestras de biopsias

65

Usando el anticuerpo GRE1 anti-VP1 de VJC de la presente invención en ensayos de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica, puede determinarse la presencia de VJC en muestras de biopsias. Este anticuerpo mostró en realidad una alta sensibilidad y especificidad por la proteína VP1 de VJC, mientras que, por el contrario, no mostró reactividad hacia VP1 de BKV.

5 Las muestras de biopsia pueden ser muestras recientes o fijadas o parafinadas. En el caso de muestras fijadas y parafinadas, si es necesario, la muestra se desparafina y la antigenicidad se restaura según procedimientos convencionales. La muestra se incuba entonces a 37°C durante 30 minutos con GRE1 (10 µg/ml en PBS). Después del período de incubación, se lava la muestra 5 veces en PBS y luego se incuba durante 30 min a 37°C con el anticuerpo anti-Fab humano conjugado con FITC o peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich®), siguiendo las directrices del fabricante. En caso del uso del anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano, es necesario añadir el sustrato (diaminobencidina, kit de sustrato DAB, Thermo Scientific) que, en presencia de peroxidasa, produce un precipitado marrón que permite visualizar la posible unión del anticuerpo.

15 La evaluación del ensayo se lleva a cabo observando la muestra bajo un microscopio de fluorescencia o con un sistema automatizado de detección de fluorescencia si se usa el anticuerpo conjugado con FITC, o por microscopía óptica o con un sistema automatizado de obtención de imágenes si se usa el anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano.

20 ELISA de captura para detectar VJC en muestras biológicas

Para llevar a cabo un ensayo ELISA con el anticuerpo GRE1 humano anti-VP1 de VJC, se cubre una placa de ELISA (Costar®) con 25 µl/pocillo de una disolución que contiene 40 ng del anticuerpo de oveja anti-Fd humano en PBS (concentración final de 1,6 µg/ml) y se incuba a 4°C durante la noche. El día siguiente, se lava la placa con agua y se bloquea con PBS-BSA al 1% (p/v) durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se añaden 40 µl de GRE1 (concentración final de aproximadamente 4 ng/µl en PBS/BSA al 1%) por pocillo y la placa se incuba entonces durante 1 hora a 37°C. Después de haber hecho 5 lavados con PBS-Tween 20 al 0,1% (Sigma-Aldrich®), mediante un lavador automático para microplacas de ELISA (ETI-System Kasher, DiaSorin), se añaden 40 µl de varias diluciones de la muestra biológica que va a someterse a prueba (diluciones de 10 veces en serie, partiendo de sin dilución hasta diluciones 1:1000) a cada pocillo. La placa se incuba entonces durante 1 hora a 37°C. Después de haber hecho varios lavados, tal como se describió anteriormente, se añaden 40 µl de una dilución 1:1000 de un anticuerpo anti-VP1 murino comercial (Abcam® diluido en PBS/BSA) a cada pocillo. La placa se deja reposar durante 1 hora a 37°C. Después de lavados adicionales, se añaden 40 µl/pocillo de una preparación policlonal de anticuerpos de cabra, que se unen a la porción Fc de IgG murina y se conjugan con peroxidasa de rábano (anticuerpo anti-IgG de ratón (específico de Fc)-peroxidasa producido en cabra, Sigma-Aldrich®). Se incuba la placa durante 45 minutos a 37°C. Después de 5 lavados con PBS-Tween 20 llevados a cabo tal como se describió anteriormente, se añaden 40 µl de sustrato (disolución 1:1 de H₂O₂ y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, kit de sustrato TMB, Thermo Scientific) a cada pocillo, para que se produzca la reacción enzimática. Después de aproximadamente 15 minutos, se bloquea la actividad enzimática añadiendo 40 µl/pocillo de H₂SO₄ 1 N (Carlo Erba) y se mide la reacción colorimétrica con un espectrofotómetro (Model 680 Microplate Reader, Bio-Rad) a una longitud de onda de 450 nm.

Se introduce antígeno BSA, u otro antígeno adecuado, en cada experimento como control negativo, cuya DO₄₅₀ se usa para detectar una posible reactividad inespecífica.

45 Ejemplo 2

Definición de la naturaleza (lineal o de conformación) del epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal GRE1

50 Con el fin de definir la naturaleza (lineal o de conformación) del epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal GRE1, se llevaron a cabo ensayos de inmunotransferencia de tipo Western y transferencia puntual tanto con la proteína desnaturalizada como con la proteína de tipo natural.

La figura 2 muestra los resultados del ensayo de inmunotransferencia de tipo Western en condiciones desnaturalizantes. La proteína se desnaturalizó con β-mercaptoetanol (β-mer) o con dodecil sulfato de sodio (SDS). El anticuerpo murino comercial se designa como Abcam, mientras que el anticuerpo monoclonal GRE1 anti-VP1 de VJC se designa como GRE.

La figura 3 muestra los resultados del ensayo de transferencia puntual realizado con VP1 desnaturalizada y VP1 en la conformación de tipo natural. El anticuerpo murino comercial se designa como Abcam, mientras que el anticuerpo monoclonal GRE1 anti-VP1 de VJC se designa como GRE de IgG.

Los resultados muestran que GRE1 no puede unirse a la forma desnaturalizada de la proteína, sino que sólo puede reconocer la proteína no desnaturalizada. En corroboración de este hecho, un anticuerpo murino comercial (Abcam®, ab34756) dirigido contra un epítipo lineal de VP1, en cambio, pudo reconocer ambas formas de la proteína. Por

tanto, estos resultados conducen a concluir que el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal GRE1 es un epítipo de conformación.

Definición de la especificidad del anticuerpo monoclonal GRE1

5 La alta homología de secuencias de nucleótidos (aproximadamente el 70%) entre el genoma del virus BK (BKV) y el genoma de VJC, los cuales son los principales poliomavirus que pueden infectar a seres humanos, se ha descrito ampliamente en la bibliografía.

10 Con el fin de determinar si GRE1 puede reconocer VJC exclusivamente, su reactividad se sometió a prueba por un ensayo ELISA contra una proteína VP1 de VJC recombinante (Abcam®, ab74569) y contra la proteína VP1 de BKV recombinante (Abcam®, ab74567). Se demostró que GRE1 puede unirse solamente a la proteína VP1 de VJC, lo que destaca su absoluta especificidad.

15 Caracterización del epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal GRE1 por mutagénesis dirigida al sitio por barrido de alanina

20 Las secuencias de aminoácidos de las proteínas VP1 de VJC y VP1 de BKV se alinearon por el programa ClustalX, con el fin de identificar las porciones que llevan los residuos que muestran una profunda diferencia (tales como carga y polaridad) entre las dos proteínas, y que pueden ser responsables de la diferencia de unión que el anticuerpo de la invención tiene hacia las dos proteínas. Se identificaron 33 residuos de aminoácidos completamente diferentes (como carga y polaridad) entre las VP1 de VJC y BKV a través de este análisis.

25 Con el fin de definir los residuos críticos de VP1 implicados en la unión con el anticuerpo monoclonal GRE1, los residuos previamente identificados se mutaron en forma individual a alanina (o a glicina, en caso de que el residuo original fuera alanina). Brevemente, la mutagénesis dirigida al sitio se realizó en el vector de expresión pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO® TA Expression Kit (Life Technologies™) donde la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína VP1 del VJC de cepa Mad1 se había clonado previamente. Los cebadores usados para la mutagénesis se diseñaron para ser de aproximadamente 30 nucleótidos de longitud y muestran una región superpuesta de 15-20
30 nucleótidos en el extremo terminal 5', de tal manera que se obtuviera un producto de mutagénesis efectivo. Después de la reacción de amplificación, el producto de PCR se digirió con la enzima *DpnI* durante 4 horas a 37°C, con el fin de eliminar el ADN metilado usado como plantilla. Después de la digestión, se usó 1 µl de la amplificación para transformar células electrocompetentes. Unas cuantas colonias transformadas se aislaron y se verificaron por secuenciación, con el fin de analizar si se insertó la mutación deseada. La VP1 mutada entonces se clonó en otro
35 vector de expresión (pCAGEN, Addgene n.º 11160).

Se transfectaron células HEK 293T (renales epiteliales humanas) con los vectores pCAG-VP1mut, y la unión del anticuerpo anti-VP1 a estas VP1 mutadas se valoró por FACS (clasificador celular activado por fluorescencia). En resumen, se transfectaron células HEK293T con 4 µg del vector donde la VP1 mutada se había clonado. Después
40 de la centrifugación y fijación con paraformaldehído al 4%, las células transfectadas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con GRE1 o el anticuerpo comercial Abcam® dirigido contra una secuencia lineal del extremo C terminal, diluido en una disolución de permeabilización a una concentración de 1 µg/ml. Las células entonces se lavaron y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con anticuerpos monoclonales conjugados con FITC antihumano o antiratón, siguiendo las indicaciones del fabricante (Sigma-Aldrich®) y, después
45 de ello, se analizaron por FACS. La reactividad observada con la proteína VP1 no mutada se consideró como el 100% de unión, en cambio, las células no transfectadas se usaron como control negativo.

Se usó el software GraphPad Prism para el análisis de los datos obtenidos por FACS y para la edición gráfica.

50 Por análisis de FACS se observó que los residuos que, si se mutaban, perturbaban la unión, eran: I62A, S65A, A127G, D130A, N131A, A133G, A175G (numeración de aminoácidos basándose en los residuos de la VP1 de cepa Mad1, empezando la numeración a partir de Met en la posición 1) (figura 4). En cambio, los residuos mutados que pueden cambiar la conformación de la proteína o disminuir drásticamente la expresión de la misma *in vitro* no se consideraron en este análisis.

55 El modelo cristalográfico ya descrito previamente en la bibliografía y presentado en el banco de datos RCSB-PDB de libre acceso (www.rcsb.org), con el código de registro 3NXG (www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3NXG) se usó para la caracterización estructural del epítipo reconocido por GRE1. El uso de este modelo permitió notar que los residuos que están lejos en el único monómero, por el contrario, están muy cerca en dos monómeros adyacentes en la forma pentamérica y absolutamente
60 contiguos a la porción de la proteína implicada en la unión con ácido siálico. Estos datos estructurales explican la considerable actividad neutralizante de GRE1.

65 Los datos experimentales obtenidos muestran que GRE1 reconoce un epítipo de conformación, no uno lineal, que comprende al menos los siguientes residuos: I62, S65, A127, D130, N131, A133, A175 (numeración de aminoácidos basándose en los residuos de la VP1 de cepa Mad1, empezando la numeración a partir de Met en la posición 1).

Particularmente, se encontró que los residuos, que si se mutan perturban la unión de GRE1, están muy cercanos a la región que es importante para la unión entre la proteína VP1 y su receptor, y esto explica la actividad neutralizante de GRE1.

5

Ensayo ELISA para la determinación *in vitro* de la presencia de anticuerpos neutralizantes en muestras biológicas

Con el fin de determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes en muestras biológicas (en particular, pero no exclusivamente, en líquido cefalorraquídeo, suero o plasma), el epítipo reconocido por GRE1 (anticuerpo neutralizante) se usó en un ensayo ELISA. La configuración de un sistema de detección rápido y efectivo se hizo con dos estrategias: una de ellas en la cual un ensayo ELISA competitivo se lleva a cabo con las muestras y GRE1, la otra en la cual la mínima porción de VP1 (que comprende los residuos entre las posiciones 50 y 140 de la proteína original) que puede aún reconocerse por el anticuerpo neutralizante se usa como el antígeno. También se configuró una variante del último ensayo, en donde las muestras biológicas que van a someterse a prueba se hicieron competir en la fase líquida contra una VP1 que sólo se muta en los residuos reconocidos por GRE1, con el fin de sustraer, de manera más efectiva de la reacción, los anticuerpos que pueden reconocer las porciones VP1 que son diferentes a las reconocidas por GRE1.

10

15

Ensayo ELISA para la determinación *in vitro* de la presencia de anticuerpos neutralizantes mediante competencia por la proteína VP1 con el anticuerpo monoclonal GRE1

20

Con el fin de distinguir GRE1 de los otros anticuerpos humanos en la muestra biológica que va a someterse a prueba, GRE1 se etiquetó por métodos de fusión de expresión génica con la secuencia de aminoácido DYKDDDDK, con el fin de reconocerse exclusivamente por el anticuerpo monoclonal comercial FLAG® M2 conjugado con peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich®).

25

La placa de ELISA (Costar®) se cubrió con 25 µl/pocillo de una disolución que contenía 300 ng de la VP1 recombinante (Abcam®, ab74569) y se incubó a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, la placa se lavó con agua y se bloqueó con PBS-BSA al 1% (p/v) durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se añadieron 40 µl de varias diluciones (diluciones de 10 veces en serie, empezando a partir de la no diluida hasta diluciones 1:1000) de la muestra biológica que va a someterse a prueba y se incubó la placa entonces durante 1 hora a 37°C. Después de eso, se añadieron 40 µl del anticuerpo GRE1 anti-VP1 de VJC (concentración final de aproximadamente 1 ng/µl en PBS/BSA al 1%) a cada pocillo con las diversas diluciones de muestra y se incubó la placa durante 30 minutos a 37°C. Después de haber hecho 5 lavados con PBS-Tween 20 al 0,1% (Sigma-Aldrich®), por un lavador automático para microplacas de ELISA (ETI-System Kasher, DiaSorin), se añadieron 40 µl/pocillo del anticuerpo comercial FLAG® M2 conjugado con peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich®). La placa entonces se incubó durante 45 minutos a 37°C. Después de haber hecho varios lavados, tal como se indicó previamente, se añadieron 40 µl de sustrato (disolución 1:1 de H₂O₂ y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, kit de sustrato TMB, Thermo Scientific) a cada pocillo, para que se produjera la reacción enzimática. Después de aproximadamente 15 minutos, se bloqueó la actividad enzimática añadiendo 40 µl/pocillo de H₂SO₄ 1 N (Carlo Erba) y se midió la reacción colorimétrica con un espectrofotómetro (lector de microplacas modelo 680, Bio-Rad) a una longitud de onda de 450 nm.

30

35

40

Se introdujo antígeno BSA, u otro antígeno adecuado, en cada experimento como control negativo, cuya D.O.₄₅₀ se usó para detectar una posible reactividad inespecífica.

45

La diferencia en absorbancia detectada en los pocillos donde se añadió el anticuerpo monoclonal con las diferentes diluciones de la muestra biológica que va a someterse a prueba, y en los pocillos donde el anticuerpo monoclonal se añadió solo, se observó con el fin de estimar la inhibición de la unión de GRE1.

50

Particularmente, si la absorbancia en los pocillos donde se añadió el anticuerpo monoclonal con las diferentes diluciones de la muestra biológica es inferior a la absorbancia observada con el anticuerpo monoclonal solo, hay una competencia por la unión de epítipos en VP1 entre GRE1 y los anticuerpos en la muestra, lo que en consecuencia indica la presencia de anticuerpos similares a VJC-GRE1 en la muestra y, de esta manera, la presencia de anticuerpos neutralizantes y protectores.

55

Ensayo ELISA para la determinación *in vitro* de la presencia de anticuerpos en muestras biológicas capaces de reconocer el mismo epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal GRE1

Con el fin de determinar la porción mínima de VP1 que contiene el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal GRE1, y aún conserva los atributos de conformación, la secuencia de nucleótidos que codifica para VP1 de VJC de cepa Mad1 se digirió con ADNasas con el fin de obtener secuencias VP1 cortadas en forma aleatoria. Se clonaron las diversas porciones de VP1 en un fagémido con el fin de seleccionar, a través de bioselección por afinidad contra GRE1, la porción de VP1 aún reconocida por el anticuerpo monoclonal. Una vez que se determinó la porción aún reconocida por GRE1, el fragmento se analizó por software específico para determinar la conformación *in silico* y posiblemente compararla con la conformación de la proteína VP1 de longitud completa.

60

65

Al tomar en consideración los resultados de esta predicción, la secuencia de nucleótidos seleccionada que codifica para la porción mínima reconocida por GRE1, y que comprende los residuos entre las posiciones 50 y 140 de la proteína original, se clonó en el vector de expresión bacteriana pET15b, en coincidencia de marco de lectura con etiqueta 6xHis y un sitio de escisión de trombina (pETminiVP1). Los sitios de restricción *XhoI* y *BamHI* (presentes en la región de clonación del vector, pero no dentro de VP1) se usaron para la clonación. Para ese fin, la región VP1 de interés se amplificó por PCR insertando, respectivamente, los sitios de restricción *XhoI* y *BamHI* en el extremo 5' y el 3'. La selección de las colonias que contenían pETminiVP1 se hizo basándose en la resistencia a ampicilina y por análisis de secuencias.

Para la purificación del fragmento, se inoculó una colonia que contenía pETminiVP1 en 10 ml de LB con ampicilina 50 µg/ml y se cultivó a 37°C durante la noche. Al día siguiente, se subinocularon 5 ml de cultivo en 500 ml de medio LB con ampicilina 50 µg/ml. El cultivo se analizó a intervalos regulares con un espectrofotómetro para comprobar el crecimiento bacteriano. Cuando el cultivo alcanzó una DO600 de 0,6-1, se añadió isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,4 mM al medio y se dejó agitar a temperatura ambiente durante la noche.

Al día siguiente, se centrifugó el cultivo bacteriano durante 15 minutos a 3900 rcf, y se resuspendió el gránulo bacteriano en 20 ml de tampón A (Tris 50 mM pH 7.5, glicerol al 5%, NaCl 250 mM, imidazol 30 mM). Las células entonces se lisaron usando un sonicador. La suspensión se centrifugó durante 45 minutos a 12.000 rcf y se filtró con filtros de 0,4 µm para eliminar los residuos bacterianos.

El fragmento entonces se purificó por cromatografía de afinidad en una columna de níquel. Antes de aplicar la muestra a la columna, la resina se lavó con 3 volúmenes de tampón A, 3 volúmenes de tampón B (Tris 20 mM pH 7,5, glicerol al 5%, NaCl 250 mM, imidazol 500 mM) y se reequilibró con 8 volúmenes de tampón A. En este momento, la muestra se corrió en la columna. 50 ml de tampón A se usaron para lavar la columna y retirar la muestra sin unir, y la muestra se eluyó con un gradiente 0%-100% de tampón B. Después de la elución, la columna se reequilibró con tampón A. Una vez concentrado, el fragmento se digirió con trombina con el fin de eliminar la cola de histidinas que pudiera afectar a la muestra biológica que va a someterse a prueba. Con el fin de eliminar trazas del tampón de elución que pudieran afectar a un posible uso del fragmento purificado, la elución se dializó contra PBS. La calidad y concentración del fragmento, el cual en adelante se denominará miniVP1, se analizaron por un gel de SDS al 12%.

Para el ELISA, la placa de 96 pocillos (Costar®) se cubrió con 25 µl/pocillo de una disolución que contenía 300 ng del fragmento miniVP1 (generado tal como se describió previamente) y se incubó a 4°C durante la noche. Al día siguiente, la placa se lava con agua y se bloquea con PBS-BSA al 1% (p/v) durante 1 hora a 37°C.

A la finalización de la incubación de la placa, se añadieron 40 µl de varias diluciones (diluciones de 10 veces en serie, empezando a partir de la no diluida hasta diluciones 1:1000) de la muestra biológica que va a someterse a prueba y se incubó la placa durante 1 hora a 37°C. Después de haber hecho 5 lavados con PBS-Tween 20 al 0,1% (Sigma-Aldrich®), por un lavador automático para microplacas de ELISA (ETI-System Kasher, DiaSorin), se añadieron 40 µl/pocillo de una preparación policlonal de anticuerpos de cabra conjugados con peroxidasa de rábano que se unen a la porción Fc de IgG humana (Sigma-Aldrich®). Se incubó la placa durante 45 minutos a 37°C. Después de 5 lavados con PBS-Tween 20 llevados a cabo tal como se describió previamente, se añadieron 40 µl de sustrato (disolución 1:1 de H₂O₂ y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, equipo de sustrato TMB, Thermo Scientific) a cada pocillo, para que se produjera la reacción enzimática. Después de aproximadamente 15 minutos, se bloqueó la actividad enzimática añadiendo 40 µl/pocillo de H₂SO₄ 1 N (Carlo Erba) y se midió la reacción colorimétrica con un espectrofotómetro (lector de microplacas modelo 680, Bio-Rad) a una longitud de onda de 450 nm.

Se introdujo antígeno BSA, u otro antígeno adecuado, en cada experimento como control negativo, cuya D.O.₄₅₀ se usó para detectar una posible reactividad inespecífica. El anticuerpo monoclonal GRE1 se usó como control positivo a una concentración final de 1 ng/µl.

Las muestras que mostraron una reactividad superior hacia miniVP1 en comparación con BSA se consideraron positivas y, de esta manera, que contenían anticuerpos similares a VJC-GRE1 con una actividad neutralizante y, de esta manera, protectora.

Ensayo ELISA para la determinación *in vitro* de la presencia de anticuerpos en muestras biológicas que pueden reconocer el mismo epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal GRE1 (una variante con competencia por una VP1 mutada)

Con el fin de incrementar la astringencia del ensayo previo, se configuró otra versión del experimento, añadiendo una etapa de preincubación de la muestra que va a someterse a prueba con una VP1 mutada en los residuos que son importantes para la unión de GRE1 a la proteína.

Con el fin de obtener la proteína VP1 modificada en los sitios de unión de GRE1, y que después actuará al

deseleccionar anticuerpos en las muestras biológicas, la estrategia de mutagénesis dirigida se usó haciendo algunos cambios: dado que algunos residuos que van a mutagenizarse son muy cercanos, se mutaron unos cuantos residuos de manera simultánea. En primer lugar, los residuos I62 y S65 se mutaron usando el siguiente cebador de avance: 5'-gttttagtaagcaGCa^{62I/A}tctataGca^{65S/A}gatac-3' (SEQ ID NO: 8) y 5'-tgacttactaaaaccctaagatgctcatctgg-3' (SEQ ID NO: 9) como el inverso. El vector pcDNATM 3.1/V5-His TOPO[®] TA Expression Kit (Life Technologies), donde la VP1 de VJC de cepa Mad1 se había clonado previamente, se usó como plantilla. Se obtuvo un producto de amplificación, que también contenía la proteína mutada, por PCR. Con el fin de retirar la plantilla de ADN usada para la reacción (que ciertamente no contendrá las mutaciones deseadas), se digirió el producto de reacción con *DpnI* durante 4 h a 37°C. Después de ello, se transformaron células electrocompetentes con 2 µl del producto de amplificación tratado previamente. Las células que contenían el plásmido se seleccionaron con base en resistencia a ampicilina y luego se verificaron por análisis de secuencias. El vector que mostró las mutaciones insertadas con la primera reacción de amplificación se usó como plantilla para la segunda reacción de amplificación, donde las posiciones 127A, 130D, 131N, 133A se mutaron. Con el fin de insertar estas mutaciones, se usó 5'-cactctaattgggcaagGa^{127A/G}actcatgCc^{130D/A}Gct^{131N/A}ggtgGa^{133A/G}ggg-3' (SEQ ID NO: 10) como cebador de avance, y 5'-cttgccattagagtgcacattcatcaaac-3' (SEQ ID NO: 11) como cebador inverso. Se digirió el producto de PCR con *DpnI* durante 4 h a 37°C. Después de ello, se transformaron células electrocompetentes con 2 µl del producto de amplificación tratado previamente. Las células que contenían el plásmido se seleccionaron basándose en la resistencia a ampicilina y luego se verificaron por análisis de secuencias. Se clonó la VP1 que, por análisis de secuencias, presentó todas las mutaciones insertadas en el vector de expresión bacteriana pET15b, en coincidencia de marco de lectura con etiqueta 6xHis y un sitio de escisión de trombina (pET-VP1mut). La VP1 mutada (VP1mut) entonces se purificó con el mismo protocolo que el usado para la purificación de miniVP1.

Para el ELISA, la placa de 96 pocillos (Costar[®]) se cubrió con 25 µl/pocillo de una disolución que contenía 300 ng de miniVP1 (generado tal como se describió previamente) y se incubó a 4°C durante la noche. Al día siguiente, la placa se lavó con agua y se bloqueó con PBS-BSA al 1% (p/v) durante 1 hora a 37°C. Mientras tanto, se preincubaron 50 µg/ml de VP1 mutada con varias diluciones (diluciones de 10 veces en serie, empezando a partir de la no diluida hasta diluciones 1:1000) de la muestra biológica que va a someterse a prueba, y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. A la finalización de la incubación de la placa, se añadieron 40 µl de la mezcla de las diversas diluciones séricas (u otra muestra biológica) con la VP1 mutada, y se incubó la placa durante 1 hora a 37°C. Después de haber hecho 5 lavados con PBS-Tween 20 al 0,1% (Sigma-Aldrich[®]), por un lavador automático para microplacas de ELISA (ETI-System Kasher, DiaSorin), se añadieron 40 µl/pocillo de una preparación policlonal de anticuerpos de cabra conjugados con peroxidasa de rábano que se unen a la porción Fc de IgG humana (Sigma-Aldrich[®]). Se incubó la placa durante 45 minutos a 37°C. Después de 5 lavados con PBS-Tween 20 llevados a cabo tal como se describió previamente, se añadieron 40 µl de sustrato (disolución 1:1 de H₂O₂ y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, equipo de sustrato TMB, Thermo Scientific) a cada pocillo, para que se produjera la reacción enzimática. Después de aproximadamente 15 minutos, se bloqueó la actividad enzimática añadiendo 40 µl/pocillo de H₂SO₄ 1 N (Carlo Erba) y se midió la reacción colorimétrica con un espectrofotómetro (lector de microplacas modelo 680, Bio-Rad) a una longitud de onda de 450 nm.

Se introdujo antígeno BSA, u otro antígeno adecuado, en cada experimento como control negativo, cuya D.O.₄₅₀ se usó para detectar una posible reactividad inespecífica. El anticuerpo monoclonal VJC-GRE1 se usó como control positivo a una concentración final de 1 ng/µl.

Las muestras que mostraron una reactividad superior hacia el péptido miniVP1 en comparación con BSA se consideraron positivas y, por tanto, que contenían anticuerpos neutralizantes similares a VJC-GRE1 y, por tanto, protectores.

Lista de secuencias

<110> POMONA RICERCA S.R.L.

<120> Anticuerpo monoclonal humano contra la proteína VP1 del virus JC

<130> PC1236EC

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 673 230 T3

Trp Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys
 1 5 10 15

Ala Val Ser Gly Ala Ser Val Ser Ser Gly Ile Asn Tyr Trp Ser Trp
 20 25 30

Ile Arg Leu Tyr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Val Tyr
 35 40 45

Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Ser
 50 55 60

Ile Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Asn Leu Arg Ser
 65 70 75 80

Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly
 85 90 95

Asp Ser Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Lys Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 2

5 <211> 105

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

10

Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 1 5 10 15

Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

ES 2 673 230 T3

	20		25		30															
Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala					
		35					40					45								
Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly					
	50					55					60									
Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp					
65					70					75					80					
Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Arg	Thr	Phe					
				85					90					95						
Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys												
			100					105												

5 <210> 3
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

tggggcccag gactggtgaa gccctcacag tcctgtccc tcaactgcmc tgtctctggt	60
gcctccgtca gcagtggat taattactgg agctggatcc gcctctaccc agggaagggc	120
ctggagtgga ttggctatgt gtattccagt gggactacgt actacaacc gtcctcaag	180
agtcgagttt ccatatcact agacacgtct aagaaccagt tctccctgaa cctgaggtct	240
gtgactgccg cggacacggc cgtgtattac tgtgagag atagggggga tagctcgggg	300
agttcctact acaagtacta catggacgtc tggggcaaag ggaccacggt caccgtctcc	360
tca	363

10
 15 <210> 4
 <211> 315
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

ES 2 673 230 T3

gtgatgacc agtctccatc ctccctgtct gcatctgtag gagacagagt caccatcact 60
 tgccgggcaa gtcagagcat tagcagctat ttaaattggt atcagcagaa accagggaaa 120
 gccctaagc tcctgatcta tgctgcatcc agtttgcaa gtgggggcc atcaaggttc 180
 agtggcagtg gatctgggac agatttcact ctcacatca gcagtctgca acctgaagat 240
 tttgcaactt actactgtca acagagttac agtaccctc gaacgttcgg ccaagggacc 300
 aaggtggaaa tcaaaa 315

<210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> cebador SEQGz

10

<400> 5

gtcgttgacc aggcagccca g 21

<210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> cebador SEQKb

20

<400> 6

atagaagttg ttcagcaggc a 21

<210> 7
 <211> 354
 <212> PRT
 <213> virus JC

25

30

<400> 7

ES 2 673 230 T3

His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln Gly Thr Ser Phe His Phe
 130 135 140

Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu Gln Gly Val Leu Phe Asn
 145 150 155 160

Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile Phe Pro Lys Asn Ala Thr
 165 170 175

Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His Lys Ala Tyr Leu Asp Lys
 180 185 190

Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val Pro Asp Pro Thr Arg Asn
 195 200 205

Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr Gly Gly Glu Asn Val Pro
 210 215 220

Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu
 225 230 235 240

Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp Asn Leu Tyr Leu Ser Ala
 245 250 255

Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg Ser Gly Ser Gln Gln Trp
 260 265 270

Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln Leu Arg Lys Arg Arg Val
 275 280 285

Lys Asn Pro Tyr Pro Ile Ser Phe Leu Leu Thr Asp Leu Ile Asn Arg
 290 295 300

Arg Thr Pro Arg Val Asp Gly Gln Pro Met Tyr Gly Met Asp Ala Gln
 305 310 315 320

Val Glu Glu Val Arg Val Phe Glu Gly Thr Glu Glu Leu Pro Gly Asp
 325 330 335

Pro Asp Met Met Arg Tyr Val Asp Lys Tyr Gly Gln Leu Gln Thr Lys
 340 345 350

Met Leu

- <210> 8
- <211> 30
- 5 <212> ADN
- <213> secuencia artificial

ES 2 673 230 T3

<220>

<223> cebador Fw de PCR

5 <400> 8

gttttagtaa gcagcatcta tagcagatac 30

<210> 9

10 <211> 33

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador Rev de PCR

<400> 9

tgacttacta aaaccctaa gatgctcatc tgg 33

20

<210> 10

<211> 39

<212> ADN

<213> secuencia artificial

25

<220>

<223> cebador Fw de PCR

<400> 10

30

cactctaatt ggcaaggaac tcatgccgct ggtggaggg 39

<210> 11

<211> 30

35 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

40 <223> cebador Rev de PCR

<400> 11

cttgccatt agagtgcaca tcatcaaac 30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo monoclonal humano dirigido contra la proteína VP1 del virus JC, que puede neutralizar el virus JC, comprendiendo el anticuerpo monoclonal humano al menos una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en el que la región variable de cadena pesada tiene la secuencia SEQ ID NO: 1 y la región variable de cadena ligera tiene la secuencia SEQ ID NO: 2, o la región variable de cadena pesada está codificada por la secuencia SEQ ID NO: 3 y la región variable de cadena ligera está codificada por la secuencia SEQ ID NO: 4.
- 10 2. Anticuerpo monoclonal humano según la reivindicación 1, que es una inmunoglobulina de longitud completa o un fragmento de inmunoglobulina funcional seleccionado del grupo que consiste en Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, anticuerpos de cadena sencilla (scFv) y anticuerpos de un solo dominio.
- 15 3. Anticuerpo monoclonal humano según la reivindicación 1 ó 2, para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico de una infección por VJC o de una enfermedad asociada con una infección por VJC.
4. Anticuerpo monoclonal humano para su uso según la reivindicación 3, en el que la enfermedad asociada con una infección por VJC es leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML).
- 20 5. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1 ó 2.
6. Composición farmacéutica según la reivindicación 5, para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico de una infección por VJC o de una enfermedad asociada con una infección por VJC.
- 25 7. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, en la que la enfermedad asociada con una infección por VJC es leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML).
- 30 8. Método de diagnóstico *in vitro* de una infección por VJC o de una enfermedad asociada con una infección por VJC, comprendiendo el método la etapa de poner en contacto una muestra biológica de un paciente, que se sospecha que está infectado con VJC, con un anticuerpo monoclonal humano según la reivindicación 1 ó 2, en condiciones adecuadas para que el anticuerpo monoclonal se una al antígeno VP1 de VJC, si está presente en la muestra, y la etapa de detectar, cualitativa o cuantitativamente, la unión del anticuerpo monoclonal al antígeno VP1 de VJC, siendo tal unión indicativa de la infección por VJC o de una enfermedad asociada con una infección por VJC.
- 35 9. Método según la reivindicación 8, en el que la enfermedad asociada con una infección por VJC es leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML).
- 40 10. Método según la reivindicación 8 ó 9, que es un ensayo ELISA inmunológico o un ensayo fluorescente inmunológico o un ensayo inmunohistoquímico.
- 45 11. Kit de inmunodiagnóstico para el diagnóstico de una infección por VJC o de una enfermedad asociada con una infección por VJC, comprendiendo el kit un anticuerpo monoclonal humano según la reivindicación 1 ó 2 e instrucciones para llevar a cabo un método de inmunodiagnóstico *in vitro*.
- 50 12. Kit de inmunodiagnóstico según la reivindicación 14, en el que el método de inmunodiagnóstico *in vitro* es un método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10.
13. Kit según la reivindicación 11 ó 12, en el que la enfermedad asociada con una infección por VJC es leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML).

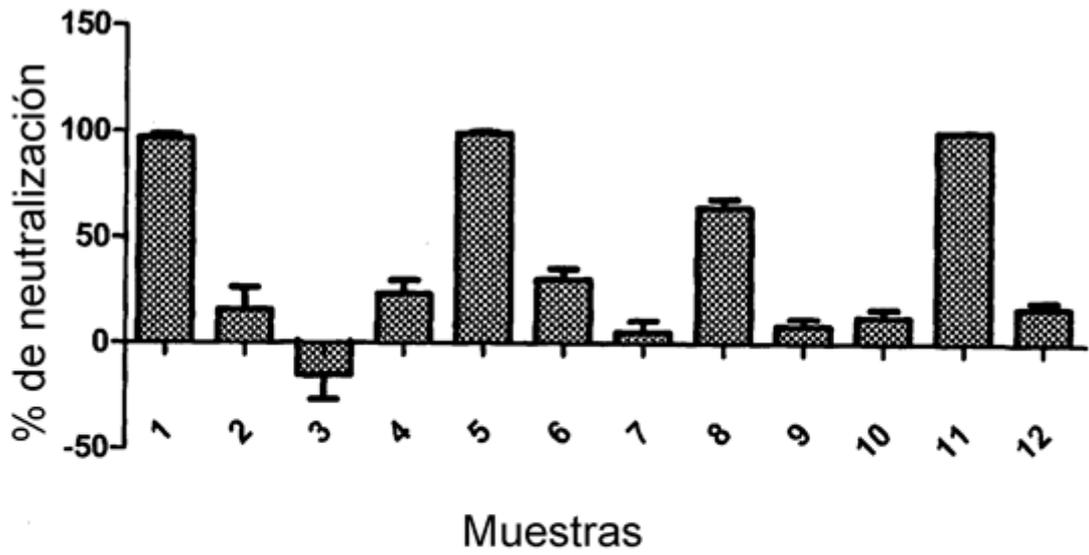


FIG.1

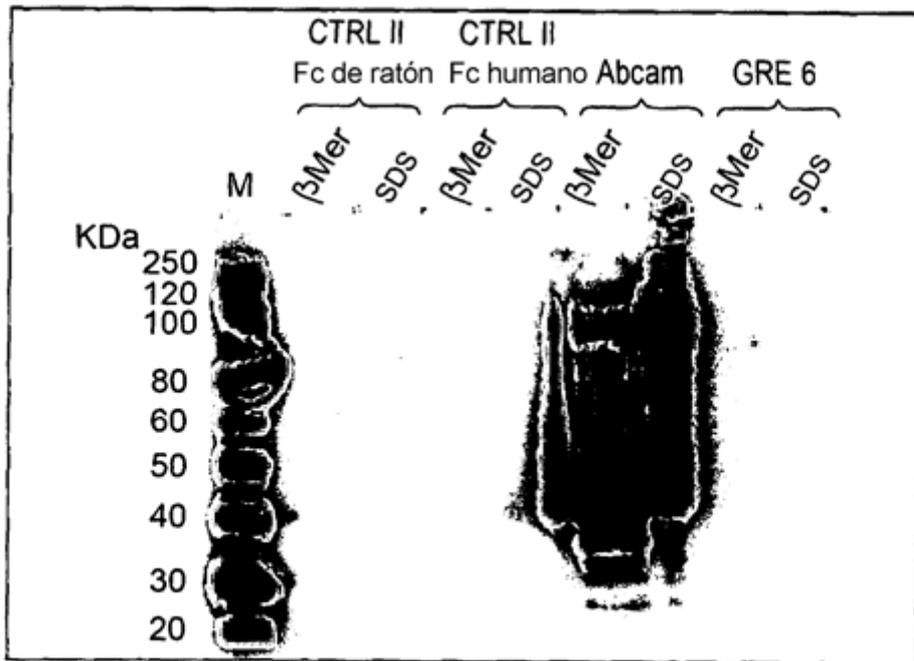


FIG.2

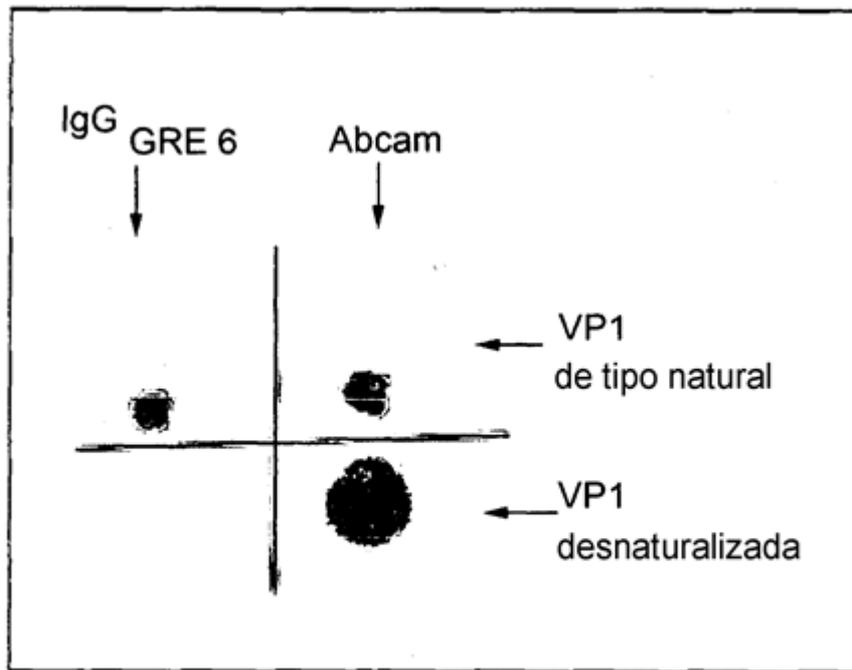


FIG.3

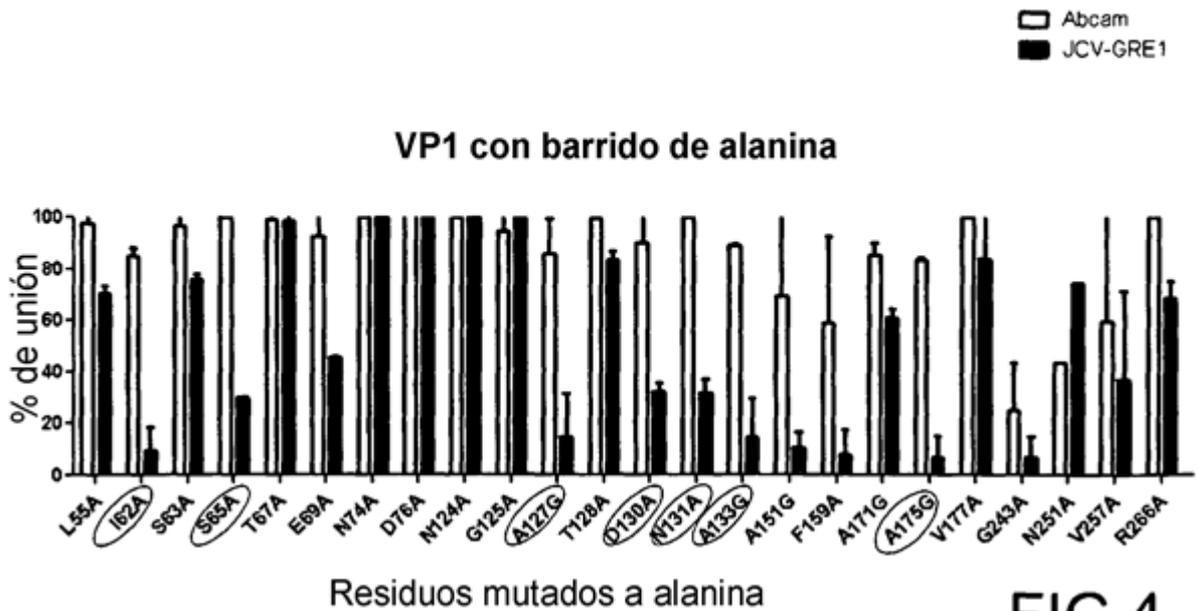


FIG.4