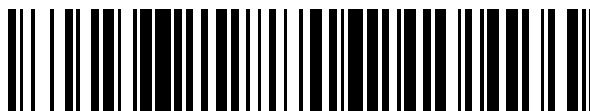


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 173**

51 Int. Cl.:

C07K 16/08 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013** **PCT/US2013/031853**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013** **WO13142300**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013** **E 13763643 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018** **EP 2828292**

54 Título: **Anticuerpos de neutralización de JCV**

30 Prioridad:

20.03.2012 US 201261613249 P

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

27.03.2019

73 Titular/es:

BIOGEN MA INC. (100.0%)
225 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

SIMON, KENNETH;
CAMERON, THOMAS;
RUSHE, MIA;
CARAVELLA, JUSTIN y
KAYNOR, GEORGE, CAMPBELL

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 706 173 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

Anticuerpos de neutralización de JCV

5 CAMPO DE LA INVENCION

En un aspecto, la descripción se refiere a anticuerpos y usos de los mismos.

ANTECEDENTES

10

El poliomavirus JC (JCV) es el agente causal de una enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central, la leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP). La incidencia de LMP puede estar relacionada con un sistema inmunitario debilitado o con el tratamiento con inmunodepresores. En la actualidad, no existe una terapia antiviral específica que se haya demostrado efectiva para el tratamiento de LMP.

15

Randhawa y col. Journal of General Virology (2009), 90, 634-639, se refiere a la identificación de epítomos específicos de especies e interactivos en cápsides de poliomavirus humano usando anticuerpos monoclonales.

RESUMEN DE LA INVENCION

20

Basándose en la descripción que está contenida en la presente memoria, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal de neutralización del virus JC aislado contra la proteína de cápside JCV VP1 (JCV-VP1), donde dicho anticuerpo monoclonal comprende:

25 un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos CDR1 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una secuencia de aminoácidos CDR2 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 y una secuencia de aminoácidos CDR3 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; y

30 un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos CDR1 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, una secuencia de aminoácidos CDR2 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y una secuencia de aminoácidos CDR3 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66.

35 En un aspecto adicional la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal de neutralización del virus JC aislado contra la proteína de cápside JCV VP1 (JCV-VP1), donde dicho anticuerpo monoclonal comprende:

un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos CDR1 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una secuencia de aminoácidos CDR2 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una secuencia de aminoácidos CDR3 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; y

un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos CDR1 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, una secuencia de aminoácidos CDR2 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y una secuencia de aminoácidos CDR3 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende las siguientes CDR: CDR1: GYTLT (SEQ ID NO: 48, h-18C9), CDR1: KASQDVGTA (SEQ ID NO: 64, 1-18C9), CDR2: LINPYHGGTRYNQKFKG (SEQ ID NO: 53, h-18C9 N55H), CDR2: WASTRHT (SEQ ID NO: 65, 1-18C9), CDR3: LGYYATGDEYFDY (SEQ ID NO: 63, h-18C9) y CDR3: QQYSSYPST (SEQ ID NO: 68, 1-18C9 C96S).

En algunas realizaciones, el anticuerpo es humanizado.

55 En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región Fc de IgG1.

En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene función efectora.

60

En algunas realizaciones, la descripción proporciona un anticuerpo aislado que comprende las SEQ ID NO: 23 (h-18C9 N55H) y SEQ ID NO: 43 (1-18C9 C96S).

5 En algunas realizaciones, la descripción proporciona un anticuerpo aislado que comprende una secuencia que tiene al menos el 80 % de homología con la SEQ ID NO: 23 (h-18C9 N55H) y una secuencia que tiene al menos el 80 % de homología con la SEQ ID NO: 43 (1-18C9 C96S).

En algunas realizaciones, la descripción proporciona un anticuerpo aislado que comprende una secuencia que tiene al menos el 90 % de homología con la SEQ ID NO: 23 (h-18C9 N55H) y una secuencia que tiene al menos el 90 %
10 de homología con la SEQ ID NO: 43 (1-18C9 C96S).

En algunas realizaciones, la descripción proporciona un anticuerpo aislado que comprende una secuencia que tiene al menos el 95 % de homología con la SEQ ID NO: 23 (h-18C9 N55H) y una secuencia que tiene al menos el 95 %
15 de homología con la SEQ ID NO: 43 (1-18C9 C96S).

En algunas realizaciones, la descripción proporciona un anticuerpo aislado que comprende una secuencia que tiene hasta 10 mutaciones en comparación con la SEQ ID NO: 23 (h-18C9 N55H) y una secuencia que tiene hasta 10 mutaciones en comparación con la SEQ ID NO: 43 (1-18C9 C96S).

20 En algunas realizaciones, la descripción proporciona un anticuerpo aislado que tiene la secuencia de cadena pesada

MDFGLSLVFLVLILKGVQCEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTLTWVK
QSHGKNLDWIGLINPYHGGTRYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVY
YCARLGGYATGDEYFDYWGGQTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
25 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHE
30 ALHNH YTKQS LS LSPG (SEQ ID NO: 71)

y/o que tiene la secuencia de cadena ligera

MRVPAQLLGLLLLWLPGARCDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVALW
35 YQKQPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSRSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSS
YPSTFGGAKLEIRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 72).

En algunas realizaciones, los aspectos de la invención se refieren a un anticuerpo de la invención para su uso en un
40 procedimiento de tratamiento de un sujeto que tiene uno o más signos o síntomas de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), o que tiene LMP, comprendiendo el procedimiento la administración de uno o más de los anticuerpos descritos en la presente memoria a un sujeto que tiene uno o más signos o síntomas de LMP, o que tiene LMP, en una cantidad terapéuticamente efectiva para tratar la LMP.

45 En algunas realizaciones, el anticuerpo cruza la barrera hematoencefálica.

En algunas realizaciones, el tratamiento produce una reducción en la carga viral, una mejora en la puntuación EDSS, una mejora en la puntuación Karnofsky, una mejora en la exploración de RM o una mejora en la cognición.

En algunas realizaciones, el sujeto está sometándose, o se ha sometido antes, a tratamiento con inmunoterapia. En
50 algunas realizaciones, el sujeto está inmunodeprimido.

La presente invención y las realizaciones de la misma se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

55 Las figuras son solo ilustrativas y no son necesarias para la habilitación de la invención descrita en la presente memoria.

La Figura 1 muestra los resultados de estudios de unión de anticuerpo CH-P18C9 a una serie de JCV-VP1 de tipo
60 silvestre y mutantes usando ELISA.

La Figura 2 muestra los resultados de estudios de unión de anticuerpo P18C9 a una serie de JCV-VP1 de tipo silvestre y mutantes usando Biacore.

5 La Figura 3 proporciona una visión general de la frecuencia de mutaciones combinadas de JCV VP1.

La Figura 4 muestra una visión general de preparaciones de virus para ensayo de infectividad.

La Figura 5 muestra una visión general de ensayo de infectividad de mutantes víricos.

10

La Figura 6 muestra los resultados del ensayo de infectividad de mutantes víricos tal como se muestra por Western blot.

La Figura 7 muestra los resultados del ensayo de infectividad de mutantes víricos tal como se muestra por Western blot.

15

La Figura 8 muestra los resultados del ensayo de infectividad de mutantes víricos tal como se muestra por Western blot.

20 La Figura 9 muestra los resultados del ensayo de infectividad de mutantes víricos tal como se muestra por Western blot.

La Figura 10 muestra una visión general de la generación de mutantes de anticuerpo 18C9

25 La Figura 11 muestra una visión general de la purificación de mutantes de anticuerpo 18C9

La Figura 12 muestra una visión general de un ensayo ELISA de unión a JCV-VLP1.

La Figura 13 muestra una visión general de los resultados de un ensayo ELISA de unión a JCV-VLP1.

30

La Figura 14 muestra una visión general de un ensayo ELISA de unión a JCV-VLP1.

La Figura 15 muestra los resultados de un ensayo ELISA de unión a JCV-VLP1.

35 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En algunos aspectos, los aspectos de la descripción se refieren a anticuerpos que se unen a una o más proteínas de virus JC (JCV). En algunos aspectos, los anticuerpos de unión a JCV son anticuerpos de neutralización que reducen o inhiben una o más funciones JCV. En algunos aspectos, un anticuerpo de neutralización inhibe replicación, proliferación y/o infectividad de JCV. En algunos aspectos, un anticuerpo de neutralización induce el aclaramiento del virus por el sistema inmunitario, bloquea las interacciones con el receptor del virus y/o desorganiza las cápsides del virus.

En algunos aspectos, los anticuerpos que se unen a una proteína de recubrimiento de JCV, por ejemplo la proteína JCV VP1, son anticuerpos de neutralización. En algunos aspectos, los anticuerpos que se unen a la bolsa de unión de ácido siálico de la proteína JCV VP1 son anticuerpos de neutralización. De forma sorprendente, un anticuerpo de neutralización de JCV que se une a VP1 puede ser efectivo contra dos o más variantes de JCV diferentes, lo que incluye variantes que tienen uno o más cambios de secuencias de aminoácidos en la bolsa de unión de ácido siálico de la proteína VP1.

50

Un anticuerpo de neutralización puede ser útil como ayuda para prevenir, abordar y/o tratar una o más condiciones asociadas con una infección por JCV. La infección por JCV es muy prevalente en seres humanos. La infección primaria con JCV puede producirse de forma asintomática durante la infancia. El JCV puede diseminarse por todo el organismo, probablemente a través de viremia y según se cree el JCV a menudo persiste principalmente en el tejido encefálico y renal. Aunque la infección por JCV es asintomática en la mayoría de los sujetos, la infección puede provocar condiciones graves (como LMP) e incluso la muerte en algunos sujetos. Los sujetos más susceptibles a LMP son sujetos que están inmunodeprimidos (por ejemplo, pacientes con SIDA) o sujetos que se someten a tratamiento con inmunosupresores (por ejemplo, después de un trasplante de órgano o para tratar una condición relacionada con inflamación tal como esclerosis múltiple). Los anticuerpos de neutralización descritos en la presente memoria pueden usarse para tratar a pacientes que están en riesgo de desarrollar una condición asociada con JCV.

60

En algunos aspectos, un paciente inmunodeprimido puede ser tratado con un anticuerpo de neutralización de JCV para reducir el riesgo de LMP u otra condición asociada con JCV incluso si el tratamiento no aclara todo el JCV del paciente. Debe observarse que al inhibir la proliferación de JCV (por ejemplo, replicación y/o diseminación de JCV en un sujeto), el riesgo de condiciones asociadas con JCV puede reducirse y/o abordarse como parte de un programa de tratamiento para un paciente inmunodeprimido. En algunos aspectos, un paciente que recibe un fármaco inmunosupresor (por ejemplo, Tysabri) puede ser objeto de seguimiento en cuanto a uno o más signos o síntomas de una condición asociada con JCV (por ejemplo, LMP). Si se detecta un signo o síntoma, puede administrarse un anticuerpo de neutralización de JCV. En algunos aspectos, el tratamiento inmunosupresor también puede suspenderse o reducirse para permitir que el sistema inmunitario del paciente se recupere y contrarreste una infección o proliferación de JCV. Sin embargo, debe observarse que un anticuerpo de neutralización de JCV puede usarse en procedimientos terapéuticos diferentes para tratar o prevenir infecciones por JCV y/o condiciones asociadas con JCV tal como se describe en más detalle en la presente memoria. Debe observarse también que un anticuerpo de neutralización de JCV puede usarse como reactivo, por ejemplo un reactivo de ensayo, para detectar la presencia de una proteína o virus JCV en una muestra. En algunos aspectos, los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden usarse como reactivos de detección o cuantificación de virus.

En algunos aspectos, algunas variantes de JCV se asocian con un mayor riesgo de una enfermedad o trastorno causados por la infección por JCV. Por ejemplo, algunas mutaciones en la bolsa de unión de ácido siálico de la proteína JCV VP1 se han asociado con un mayor riesgo de LMP. En algunos aspectos, un anticuerpo de neutralización de JCV es específico para una o más variantes de JCV. En algunos aspectos, un anticuerpo de neutralización de JCV se une a una pluralidad de variantes de JCV con afinidad suficiente para ser terapéuticamente efectivas contra dichas variantes. En algunos aspectos, un anticuerpo de neutralización de JCV se une a la bolsa de unión de ácido siálico del virus JCV. Debe observarse que se ha referido que la bolsa de unión de ácido siálico es el dominio de interacción del receptor del virus. En algunos aspectos, la bolsa de unión de ácido siálico incluye los aminoácidos 55-76 y los aminoácidos 265-273 de JCV (véase, por ejemplo, Gee y col., 2004, JBC 279: 49172-49176). En algunos aspectos, un anticuerpo de neutralización de JCV se une a una pluralidad de variantes de JCV cada una de las cuales tiene uno o más cambios de aminoácidos en la bolsa de unión de ácido siálico. Sin embargo, en algunos aspectos, algunos cambios de aminoácidos en la bolsa de unión de ácido siálico reducen la unión (e inhibición) por un anticuerpo de neutralización de JCV. En algunos aspectos, en un sujeto se realiza un cribado de signos de una infección por JCV. En algunos aspectos, en un sujeto se realiza un cribado de infección por una variante de JCV. En algunos aspectos, un sujeto (por ejemplo, un sujeto del que se sabe que tiene una infección por JCV) puede ser objeto de seguimiento sobre la aparición de una o más variantes de JCV de alto riesgo. Un resultado positivo de infección por JCV y/o de la presencia de ciertas variantes de JCV en una muestra de un paciente puede usarse como base para iniciar el tratamiento con un anticuerpo de neutralización de JCV. Sin embargo, debe observarse que en algunos aspectos un anticuerpo de neutralización de JCV puede administrarse a un paciente basándose en el aumento del riesgo de infección o proliferación de JCV y/o en un mayor riesgo de una condición asociada con JCV, con independencia de si se ha realizado o no un ensayo de detección de JCV en el paciente.

Una reducción en replicación, proliferación, infectividad del virus JC y/o cualquier otra función causada por un anticuerpo puede medirse (por ejemplo, usando un ensayo *in vitro* y/o *in vivo*) comparando una o más funciones JCV sobre la presencia con respecto a la ausencia del anticuerpo. En algunos aspectos, un anticuerpo de neutralización puede producir la reducción en una o más funciones del virus (por ejemplo, replicación, proliferación, infección, etc.) en aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, o más.

Anticuerpos:

En algunos aspectos, un anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que está elevado frente a un JCV VLP. En algunos aspectos, el anticuerpo es específico para JCV. En algunos aspectos, el anticuerpo es específico para JCV VP1.

En algunos aspectos, un anticuerpo de neutralización que es específico para JCV tiene un efecto de neutralización en la actividad de JCV que es significativamente mayor que su efecto de neutralización en la actividad de uno o más de entre otros virus, por ejemplo, de un virus relacionado (por ejemplo, virus BK). Sin embargo, en algunos aspectos, un anticuerpo de neutralización puede unirse a uno o más virus con afinidad suficiente para ser útiles en el tratamiento de una o más infecciones víricas diferentes.

En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunos aspectos, el anticuerpo es humanizado. En algunas realizaciones, un anticuerpo tiene la secuencia de 18C9 tal como se describe en la

presente memoria.

En algunos aspectos, un anticuerpo comprende una o más de las siguientes secuencias CDR: CDR1: SEQ ID NO: 48, 64; CDR2: SEQ ID NO: 49-62, 65; CDR3: SEQ ID NO: 63, 66-70.

5 En algunos aspectos, un anticuerpo comprende una o más de las siguientes secuencias CDR: CDR1: GYTTL (SEQ ID NO: 48, h-18C9), CDR1: KASQDVGTA (SEQ ID NO: 64, 1-18C9), CDR2: LINPYXXGTRYNQKFKG (SEQ ID NO: 62, h-18C9 N55X N56X), CDR2: WASTRHT (SEQ ID NO: 65, 1-18C9), CDR3: LGYYATGDEYFDY (SEQ ID NO: 63, h-18C9), CDR3: QQYSSYPXT (SEQ ID NO: 70, 1-18C9 C96X), y secuencias CDR con hasta dos mutaciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NO: 48, 64, 62, 65, 63 y 70.

15 En algunos aspectos, un anticuerpo comprende una o más de las siguientes secuencias CDR: CDR1: GYTTL (SEQ ID NO: 48, h-18C9), CDR1: KASQDVGTA (SEQ ID NO: 64, 1-18C9), CDR2: LINPYHGGTRYNQKFKG (SEQ ID NO: 53, h-18C9 N55H), CDR2: WASTRHT (SEQ ID NO: 65, 1-18C9), CDR3: LGYYATGDEYFDY (SEQ ID NO: 63, h-18C9), CDR3: QQYSSYPST (SEQ ID NO: 68, 1-18C9 C96S), y secuencias CDR con hasta dos mutaciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NO: 48, 64, 53, 65, 63 y 68.

20 En algunos aspectos, un anticuerpo comprende una o más de las siguientes secuencias CDR: CDR1: GYTTL (SEQ ID NO: 48, h-18C9), CDR1: KASQDVGTA (SEQ ID NO: 64, 1-18C9), CDR2: LINPYHGGTRYNQKFKG (SEQ ID NO: 53, h-18C9 N55H), CDR2: WASTRHT (SEQ ID NO: 65, 1-18C9), CDR3: LGYYATGDEYFDY (SEQ ID NO: 63, h-18C9), CDR3: QQYSSYPST (SEQ ID NO: 68, 1-18C9 C96S).

25 En algunos aspectos, un anticuerpo comprende una o más de las siguientes CDR: CDR3: LGYYATGDEYFDY (SEQ ID NO: 63, h-18C9), CDR3: QQYSSYPST (SEQ ID NO: 68, 1-18C9 C96S), y secuencias CDR con hasta dos mutaciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NO: 63 y 68.

En algunos aspectos, un anticuerpo comprende las siguientes CDR: GYTTL (SEQ ID NO: 48, h-18C9), CDR2: LINPYHGGTRYNQKFKG (SEQ ID NO: 53, h-18C9 N55H), y CDR3: LGYYATGDEYFDY (SEQ ID NO: 63, h-18C9).

30 En algunos aspectos, un anticuerpo comprende las siguientes CDR: CDR1: KASQDVGTA (SEQ ID NO: 64, 1-18C9), CDR2: WASTRHT (SEQ ID NO: 65, 1-18C9), y CDR3: QQYSSYPST (SEQ ID NO: 68, 1-18C9 C96S).

35 En algunos aspectos, un anticuerpo comprende una o más de las siguientes CDR: CDR1: GYTTL (SEQ ID NO: 48, h-18C9), CDR1: KASQDVGTA (SEQ ID NO: 64, 1-18C9), CDR2: LINPYHGGTRYNQKFKG (SEQ ID NO: 53, h-18C9 N55H), CDR2: WASTRHT (SEQ ID NO: 65, 1-18C9), CDR3: LGYYATGDEYFDY (SEQ ID NO: 63, h-18C9), y CDR3: QQYSSYPST (SEQ ID NO: 68, 1-18C9 C96S).

40 En algunos aspectos, un anticuerpo tiene la siguiente CDR3 de cadena pesada: LGYYATGDEYFDY (SEQ ID NO: 63, h-18C9), y/o la siguiente CDR3 de cadena ligera: QQYSSYPST (SEQ ID NO: 68, 1-18C9 C96S).

En algunos aspectos, un anticuerpo tiene la siguiente CDR2 de cadena pesada: LINPYHGGTRYNQKFKG (SEQ ID NO: 53, h-18C9 N55H), y/o la siguiente CDR2 de cadena ligera: WASTRHT (SEQ ID NO: 65, 1-18C9).

45 En algunos aspectos, un anticuerpo tiene la siguiente CDR1 de cadena pesada: GYTTL (SEQ ID NO: 48, h-18C9), y/o la siguiente CDR1 de cadena ligera: KASQDVGTA (SEQ ID NO: 64, 1-18C9),

En algunos aspectos, un anticuerpo tiene una región variable de cadena pesada que tiene una de las siguientes SEQ ID NO: 9, 10, 16-39. En algunos aspectos, un anticuerpo tiene una región variable de cadena ligera que tiene una de las siguientes SEQ ID NO: 11, 12, 40-47

50 En algunas realizaciones, un anticuerpo tiene una región variable de cadena pesada que tiene la SEQ ID NO: 23 (h-18C9 N55H). En algunas realizaciones, un anticuerpo tiene una región variable de cadena ligera que tiene la SEQ ID NO: 43 (1-18C9 C96S).

55 En algunas realizaciones, un anticuerpo puede ser sustancialmente un anticuerpo de unión a VP-1 de longitud completa o un fragmento funcional del mismo. Por ejemplo, si un fragmento de un anticuerpo de unión a VP-1 es suficiente para permitir la unión específica por un anticuerpo que se une específicamente a un anticuerpo de unión a VP-1 es un anticuerpo de unión a VP-1 funcional y puede usarse en los procedimientos y kits de la descripción. En algunas realizaciones, puede usarse un fragmento de anticuerpo si proporciona una unión suficiente para inhibir la función de JCV y/o para ser útil como agente de detección de JCV. Un experto en la materia podrá identificar

fragmentos de anticuerpo de unión a VP-1 y determinar si un fragmento de anticuerpo de unión a VP-1 es un fragmento de anticuerpo de unión a VP-1 funcional usando solo procedimientos y ensayos de unión rutinarios (por ejemplo, ensayos de competición que usan un anticuerpo de unión a VP-1 sustancialmente de longitud completa descrito en la presente memoria).

5

En algunas realizaciones, un anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico que contiene una región variable (por ejemplo, una región variable humanizada) de una primera especie (por ejemplo, un ratón) y una región Fc de una segunda especie (por ejemplo, un ser humano). Como será evidente para un experto en la materia, la presente descripción también proporciona fragmentos de F(ab')₂, Fab, Fv y Fd; anticuerpo quiméricos en los que las regiones Fc y/o FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera han sido sustituidas por secuencias humanas y no humanas homólogas; anticuerpos de fragmentos de F(ab')₂ quiméricos en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera han sido sustituidas por secuencias humanas o no humanas homólogas; anticuerpos de fragmentos de Fab quiméricos en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera han sido sustituidas por secuencias humanas o no humanas homólogas; y anticuerpos de fragmentos de Fd quiméricos en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 han sido sustituidas por secuencias humanas o no humanas homólogas.

En ciertos aspectos, un anticuerpo de neutralización de JCV puede ser un anticuerpo monocatenario anti-VP1, un anticuerpo de dominio único o un Nanocuerpo™. Las características de cada uno de estos tipos de anticuerpos y los procedimientos para su uso son bien conocidas en la técnica. Los Nanocuerpos™ son los fragmentos funcionales de anticuerpos más pequeños y se obtienen de anticuerpos monocatenarios presentes en la naturaleza (véase Ablynx, Bélgica; ablynx.com). La tecnología de Nanocuerpos™ se desarrolló después del descubrimiento de que los camélidos (camellos y llamas) poseen un repertorio único de anticuerpos totalmente funcionales que carecen de cadenas ligeras. La estructura de los Nanocuerpos™ consiste en un único dominio variable (VHH), una región bisagra y dos dominios constantes (CH2 y CH3). El dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido estable que aloja la capacidad de unión a antígeno completa de la cadena pesada original. Los Nanocuerpos™ combinan las características de los anticuerpos convencionales con características de los fármacos de moléculas pequeñas. Los Nanocuerpos™ muestran una alta especificidad diana y una baja toxicidad inherente. Por otra parte, los Nanocuerpos™ son muy estables, pueden administrarse por medios diferentes de la inyección y son fáciles de fabricar. En ciertos aspectos, un anticuerpo de neutralización de JCV terapéutico, una fracción de inmovilización y/o una fracción de detección pueden ser un Nanocuerpo™ humanizado.

En algunos aspectos, un anticuerpo de neutralización de JCV de ejemplo tiene una o más CDR, por ejemplo, las tres CDR de cadena pesada (HC) y/o las tres CDR de cadena ligera (LC) de un anticuerpo en particular descrito en la presente memoria, o las CDR que tienen, en suma, una identidad de al menos el 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % con dicho anticuerpo, por ejemplo, CDR1: SEQ ID NO: 48 y 64; CDR2: SEQ ID NO: 49-62 y 65; CDR3: SEQ ID NO: 63, 66-70. En algunos aspectos, un anticuerpo de neutralización de JCV de ejemplo tiene una, dos, tres, cuatro, cinco o seis de las CDR, por ejemplo, las tres CDR de cadena pesada (HC) y/o las tres CDR de cadena ligera (LC) de un anticuerpo en particular descrito en la presente memoria. En algunos aspectos, un anticuerpo de neutralización de JCV de ejemplo tiene una o más CDR, por ejemplo, las tres CDR HC y/o las tres CDR LC de un anticuerpo en particular descrito en la presente memoria, o CDR que incluyen uno, hasta dos, hasta tres, hasta cuatro, hasta cinco, hasta seis, hasta siete, hasta ocho, hasta nueve o hasta diez cambios de aminoácidos en comparación, por ejemplo, con CDR1: SEQ ID NO: 48 y 64; CDR2: SEQ ID NO: 49-62 y 65; CDR3: SEQ ID NO: 63, 66-70. En un aspecto, los bucles hipervariables H1 y H2 tienen la misma estructura canónica que los de un anticuerpo descrito en la presente memoria. En un aspecto, los bucles hipervariables L1 y L2 tienen la misma estructura canónica que los de un anticuerpo descrito en la presente memoria.

En un aspecto, la secuencia de aminoácidos de la secuencia de dominio variable de HC y/o LC tiene al menos el 70, 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99 o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada (HC) y/o cadena ligera (LC) de un anticuerpo descrito en la presente memoria, por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-47. La secuencia de aminoácidos de la secuencia de dominio variable de HC y/o LC puede diferir en al menos un aminoácido, pero no más de diez, ocho, seis, cinco, cuatro, tres o dos aminoácidos con respecto a la secuencia correspondiente de un anticuerpo descrito en la presente memoria, por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-47. Por ejemplo, las diferencias pueden estar principal o totalmente en las regiones marco.

55

Las secuencias de aminoácidos de las secuencias de dominio variable de HC y LC pueden codificarse por una secuencia que se hibrida en condiciones de alta astringencia con una secuencia de ácidos nucleicos descrita en la presente memoria o que codifica un dominio variable o un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos descrita en la presente memoria. En una realización, las secuencias de aminoácidos de una o más regiones marco (por ejemplo, FR1, FR2, FR3 y/o FR4) del dominio variable de HC y/o LC tienen al menos el 70, 80,

60

85, 90, 92, 95, 97, 98, 99 o 100 % de identidad con las regiones marco correspondientes de los dominios variables de HC y LC de un anticuerpo descrito en la presente memoria. En una realización, una o más regiones marco de cadena pesada o ligera (por ejemplo, HC FR1, FR2 y FR3) tienen al menos el 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 100 % de identidad con la secuencia de las regiones marco correspondientes de un anticuerpo humano de línea germinal.

5

Los cálculos de "homología" o "identidad de secuencias" entre dos secuencias (los términos se usan indistintamente en la presente memoria) pueden realizarse de la forma siguiente. Las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o las dos de entre una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos para alineación óptima y pueden desestimarse las secuencias no homólogas con fines de comparación). La alineación óptima se determina como la mejor puntuación usando el programa GAP en el paquete de software GCG con una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización por huecos de 12, una penalización extendida por huecos de 4 y una penalización por desplazamiento de marco de 5. A continuación se comparan los residuos de aminoácidos o los nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o las posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácidos o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (tal como se usa en la presente memoria, "identidad" de aminoácidos o ácidos nucleicos es equivalente a "homología" de aminoácidos o ácidos nucleicos). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias.

10

15

20 El experto en la materia comprenderá que pueden realizarse sustituciones de aminoácidos conservadoras en anticuerpos de neutralización de JCV para proporcionar variantes funcionalmente equivalentes de estos anticuerpos, por ejemplo, las variantes conservan las capacidades funcionales de inhibir una o más funciones JCV. Tal como se usa en la presente memoria, una "sustitución de aminoácidos conservadora" se refiere a una sustitución de aminoácidos que no altera las características de carga relativa o tamaño de la proteína en la que se realiza la sustitución de aminoácidos. Las variantes pueden prepararse de acuerdo con procedimientos para alterar la secuencia de polipéptidos conocida por un experto en la materia tal como se encuentra en las referencias que compilan dichos procedimientos, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, y col., eds., Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, o Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, y col., eds., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Las variantes de anticuerpos de neutralización de JCV de ejemplo funcionalmente equivalentes incluyen sustituciones de aminoácidos conservadoras en las secuencias de aminoácidos de proteínas descritas en la presente memoria. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras incluyen sustituciones realizadas entre aminoácidos dentro de los grupos siguientes: (a) M, I, L, V; (b) F, Y5 W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; y (g) E, D.

25

30

35

40

Tal como se usa en la presente memoria, el término "se hibrida en condiciones de alta astringencia" describe condiciones de hibridación y lavado. Puede encontrarse una orientación para realizar reacciones de hibridación en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. En esta referencia se describen procedimientos acuosos y no acuosos y puede usarse cualquiera. Las condiciones de hibridación de alta astringencia pueden incluir hibridación en 6X SSC a aproximadamente 45 °C, seguido por uno más lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1 % a 65 °C, o condiciones sustancialmente similares.

Los anticuerpos pueden someterse a ensayo sobre propiedad funcional, por ejemplo, neutralización de JCV, por ejemplo, tal como se describe en la presente memoria o usando otras técnicas para evaluar la replicación, propagación, infectividad y/u otra función en JCV.

45

En algunos aspectos, puede usarse una combinación de dos o más anticuerpos diferentes. En algunos aspectos, puede usarse uno o más anticuerpos en combinación con uno o más de entre otros agentes. En algunos aspectos, pueden usarse anticuerpos tetravalentes, anticuerpos acoplados con transportadores de la barrera hematoencefálica, anticuerpos acoplados con reactivos de colorante de contraste y/o anticuerpos radiomarcados (por ejemplo, como marcadores de presencia de JCV en pacientes).

50

Obtención de anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos:

Los anticuerpos de neutralización de JCV pueden generarse por inmunización, por ejemplo, usando un animal tal como un ratón. Como inmunógeno puede usarse JCV VLP o una proteína VLP (por ejemplo, VP1).

55

En algunos aspectos, puede usarse una VLP o proteína VLP que tiene una secuencia de tipo silvestre o normal. En algunos aspectos, puede usarse una VLP o proteína VLP que tiene una o más mutaciones (por ejemplo, en la bolsa de unión de ácido siálico de VP1) como inmunógeno.

60

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en la presente memoria. Un anticuerpo o inmunoglobulina comprende al menos el dominio variable de una cadena pesada, y normalmente comprende al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera. Las estructuras básicas de las inmunoglobulinas en los sistemas vertebrados se conocen relativamente bien. Véase, por ejemplo, Harlow y col.,

5 Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988). Los anticuerpos o inmunoglobulinas incluyen clases amplias de polipéptidos que pueden distinguirse bioquímicamente. Los expertos en la materia observarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, con algunas subclases entre ellas (por ejemplo, gamma1-gamma4). Es la naturaleza de esta cadena la que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgG o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulinas (isotipos), por
10 ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc., están bien caracterizadas y se sabe que confieren especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fáciles de discernir para el experto en la materia a la vista de la presente descripción y pueden obtenerse o diseñarse anticuerpos de neutralización de JCV de diferentes clases tal como se describe en la presente memoria. Debe observarse que todas las clases de inmunoglobulinas están dentro del alcance de la presente invención. Sin embargo, la siguiente exposición se dirigirá
15 en general a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulinas. Con respecto a IgG, una molécula de inmunoglobulina estándar comprende dos polipéptidos de cadena ligera idénticos de peso molecular de aproximadamente 23.000 Daltons, y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos de peso molecular 53.000-70.000. Las cuatro cadenas están unidas normalmente por enlaces disulfuro en una configuración en "Y" donde las cadenas ligeras comprenden las cadenas pesadas a partir de la parte ancha de la "Y" y siguiendo a través de la región variable.

20 Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Cada clase de cadena pesada puede unirse con una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas están unidas de forma covalente entre sí, y las porciones de "cola" de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro covalentes o enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas son generadas por hibridomas, linfocitos B o células
25 hospedadoras diseñadas genéticamente. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos discurren desde un extremo N en los extremos en horquilla de la configuración Y hasta el extremo C en la parte inferior de cada cadena.

Las cadenas ligeras y pesadas se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se usan funcionalmente. A este respecto, se observará que los dominios variables de las
30 porciones de cadena ligera (VL) y pesada (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad de antígenos. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren importantes propiedades biológicas tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión a receptores Fc, unión a complemento, y similares. Por convenio, la numeración de los dominios de regiones constantes aumenta a medida que son más distales desde el sitio de unión a antígeno o el extremo amino del anticuerpo. La porción en el extremo
35 N es una región variable y la porción en el extremo C es una región constante; los dominios CH3 y CL comprenden en realidad el extremo carboxi de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

Tal como se describe en la presente memoria, la región variable permite que el anticuerpo reconozca selectivamente y se una específicamente a epítopos en los antígenos. Es decir, el dominio VL y el dominio VH, o subconjunto de las
40 regiones de determinación de complementariedad (CDR), de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión a antígeno tridimensional. Esta estructura de anticuerpo cuaternaria forma el sitio de unión a antígeno presente en el extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión a antígeno está definido por tres CDR en cada una de las cadenas VH y VL. En algunos aspectos, por ejemplo, algunas moléculas de inmunoglobulinas se obtuvieron de especies de camélidos o se diseñaron basándose en
45 inmunoglobulinas de camélidos, una molécula de inmunoglobulina completa puede consistir solo en cadenas pesadas, sin cadenas ligeras. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman y col., Nature 363:446-448 (1993).

En anticuerpos presentes en la naturaleza, las seis "regiones de determinación de complementariedad" o "CDR" presentes en cada dominio de unión a antígeno son secuencias de aminoácidos cortas no contiguas que están
50 colocadas específicamente para formar el dominio de unión a antígeno cuando el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un entorno acuoso. El resto de los aminoácidos en los dominios de unión a antígenos, referidos como regiones "marco", muestran menor variabilidad intermolecular. Las regiones marco adoptan en gran medida una conformación en láminas beta y las CDR forman bucles que se conectan con, y en algunos casos forman parte de, la estructura de láminas beta. Así, las regiones marco actúan para formar un andamiaje que proporciona un
55 posicionamiento de las CDR en orientación correcta mediante interacciones no covalentes entre cadenas. El dominio de unión a antígeno formado por las CDR posicionadas define una superficie complementaria al epítipo en el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo a su epítipo correspondiente. Los aminoácidos que comprenden las CDR y las regiones marco, respectivamente, pueden ser identificadas fácilmente para cualquier región variable de cadena pesada o ligera dada por un experto en
60 la materia, ya que se han definido de manera precisa (véase "Secuencias de proteínas de interés inmunológico",

Kabat, E., y col., Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU. (1983); y Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987).

Debe observarse que los anticuerpos obtenidos tal como se describe en la presente memoria pueden ser modificados para eliminar o sustituir una o más CDR. En algunos aspectos, pueden generarse fragmentos de unión a antígenos que conservan la especificidad de antígenos pero carecen de una o más de las seis CDR de un anticuerpo de longitud completa. Alternativamente, puede conservarse una o más CDR de un anticuerpo (por ejemplo, CDR3) y una o más de las otras CDR pueden diseñarse y/o sustituirse por una CDR diferente, por ejemplo, para modificar la especificidad de unión y/o la afinidad a antígenos.

En el caso en que existan dos o más definiciones de un término que se usa y/o acepta en la técnica, la definición del término tal como se usa en la presente memoria pretende incluir todos estos significados salvo que se indique explícitamente lo contrario. Un ejemplo concreto es el uso del término "región de determinación de complementariedad" ("CDR") para describir los sitios de combinación de antígenos no contiguos presentes en la región variable de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Esta región en particular ha sido descrita por Kabat y col., Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., "Secuencias de proteínas de interés inmunológico" (1983) y por Chothia y col., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), donde las definiciones incluyen la superposición o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. No obstante, la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes del mismo pretende incluirse dentro del alcance del término tal como se define y se usa en la presente memoria. Los números de residuos exactos que comprenden una CDR en particular variarán según la secuencia y el tamaño de la CDR. Los expertos en la materia pueden determinar de forma rutinaria los residuos que comprende una CDR en particular dada la secuencia de aminoácidos de región variable del anticuerpo.

Kabat y col. definieron también un sistema de numeración para secuencias de dominio variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto en la materia puede asignar sin ambigüedades este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de dominio variable, sin depender de datos experimentales ajenos a la secuencia en sí. Tal como se usa en la presente memoria, "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración expuesto por Kabat y col., Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., "Secuencia de proteínas de interés inmunológico" (1983). Salvo que se especifique lo contrario, las referencias a la numeración de posiciones de residuos de aminoácidos específicas en un anticuerpo de neutralización o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la presente descripción, incluyendo la presente invención, están de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

En especies de camélidos, la región variable de cadena pesada, referida como VHH, forma el dominio de unión a antígeno completo. Las principales diferencias entre las regiones variables de VHH de camélidos y las derivadas de anticuerpos convencionales (VH) incluyen (a) más aminoácidos hidrófobos en la superficie de contacto de la cadena ligera de VH en comparación con la región correspondiente en VHH, (b) una CDR3 más larga en VHH, y (c) la aparición frecuente de un enlace disulfuro entre CDR1 y CDR3 en VHH.

Tal como se describe en la presente memoria, los anticuerpos de unión a JCV o fragmentos de unión a antígenos, variantes o derivados de los mismos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos de unión a epítopos, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fv unidos a disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden un dominio VL o VH, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (que incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para los anticuerpos de neutralización descritos en la presente memoria). Las moléculas scFv son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 5.892.019. Las moléculas de inmunoglobulinas o anticuerpos de neutralización de JCV pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de moléculas de inmunoglobulina.

Los fragmentos de anticuerpos de neutralización de JCV, que incluyen anticuerpos monocatenarios, pueden comprender la o las regiones variables en solitario o en combinación con la totalidad o una parte de los siguientes: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. Además, fragmentos de unión a antígenos de neutralización de JCV pueden comprender cualquier combinación de región o regiones variables con una región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "porción de cadena pesada" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena pesada de inmunoglobulinas. Un polipéptido que comprende una porción de cadena pesada comprende al menos uno de entre: un dominio CH1, un dominio (por ejemplo, región bisagra superior, media

y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3, o una variante o fragmento del mismo. Por ejemplo, un polipéptido de unión para su uso en la invención puede comprender una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1; una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra, y un dominio CH2; una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1 y un dominio CH3; una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra, y un dominio CH3, o una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra, un dominio CH2, y un dominio CH3. En otra realización, un polipéptido de la invención comprende una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH3. Además, un polipéptido de unión para su uso en la invención puede carecer de al menos una porción de un dominio CH2 (por ejemplo, parte o la totalidad de un dominio CH2). Tal como se expone anteriormente, un experto en la materia comprenderá que estos dominios (por ejemplo, las porciones de cadena pesada) pueden modificarse de manera que varíen en secuencias de aminoácidos con respecto a la molécula de inmunoglobulina presente en la naturaleza.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "porción de cadena ligera" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena ligera de inmunoglobulinas. Preferentemente, la porción de cadena ligera comprende al menos uno de entre un dominio VL o CL.

Los anticuerpos de neutralización, o fragmentos de unión a antígenos, variantes, o derivados de los mismos descritos en la presente memoria pueden describirse o especificarse en términos del o de los epítopos o porciones de un antígeno, por ejemplo, un polipéptido diana de la proteína JCV VP1 que reconocen o al que se unen específicamente. La porción de un polipéptido diana que interacciona específicamente con el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo es un "epítipo", o un "determinante antigénico". Un polipéptido diana puede comprender un único epítipo, aunque normalmente comprende al menos dos epítopos, y puede incluir cualquier número de epítopos, dependiendo del tamaño, la conformación y el tipo de antígeno. Además, debe observarse que un "epítipo" en un polipéptido diana puede ser o incluir elementos no polipeptídicos, por ejemplo, un epítipo puede incluir una cadena lateral de hidratos de carbono.

Según se cree el tamaño mínimo de un epítipo peptídico o polipeptídico para un anticuerpo es de aproximadamente cuatro a cinco aminoácidos. Los epítopos peptídicos o polipeptídicos contienen preferentemente al menos siete, más preferentemente al menos nueve y con la máxima preferencia entre al menos aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos. Dado que una CDR puede reconocer un o polipéptido antigénico en su forma terciaria, no es necesario que los aminoácidos que comprenden un epítipo sean contiguos, y en algunos casos, pueden incluso no estar en la misma cadena peptídica. En algunos aspectos, un epítipo peptídico o polipeptídico reconocido por los anticuerpos de neutralización descritos en la presente memoria contiene una secuencia de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, más preferentemente al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25 o entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos contiguos o no contiguos de una proteína JCV VLP (por ejemplo, VP1). (Véase, por ejemplo, el documento WO 2010/090757)

Por "se une específicamente a" se entiende en general que un anticuerpo se une a un epítipo por medio de su dominio de unión a antígeno, y que la unión conlleva cierta complementariedad entre el dominio de unión a antígeno y el epítipo. De acuerdo con esta definición, se dice que un anticuerpo "se une específicamente" a un epítipo cuando se une a ese epítipo, por medio de su dominio de unión a antígeno más fácilmente de lo que sucedería con un epítipo aleatorio no relacionado. El término "especificidad" se usa en la presente memoria para designar la afinidad relativa por la que un anticuerpo determinado se une con un epítipo determinado.

Se dice que un anticuerpo inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo de referencia para un epítipo dado si se une preferentemente a ese epítipo en la medida en que bloquea, en cierto grado, la unión del anticuerpo de referencia al epítipo. La inhibición competitiva puede determinarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, ensayos ELISA de competición. Puede decirse que un anticuerpo inhibe competitivamente la unión del anticuerpo de referencia a un epítipo dado en al menos el 90 %, al menos el 80 %, al menos el 70 %, al menos el 60 % o al menos el 50 %.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "afinidad" se refiere a una medida de la fuerza de la unión de un epítipo individual con la CDR de una molécula de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988) en las páginas 27-28. Tal como se usa en la presente memoria, el término "avidez" se refiere a la estabilidad global del complejo entre una población de inmunoglobulinas y un antígeno, es decir, la fuerza de combinación funcional de una mezcla de inmunoglobulinas con el antígeno. Véase, por ejemplo, Harlow en las páginas 29-34. La avidez está relacionada con la afinidad de moléculas de inmunoglobulina individuales en la población con epítopos específicos, y también con las valencias de las inmunoglobulinas y el antígeno. Por ejemplo, la interacción entre un anticuerpo monoclonal bivalente y un

antígeno con una estructura de epítipo de alta repetición, tal como un polímero, sería una de alta avidéz.

Los anticuerpos de neutralización o fragmentos de unión a antígenos, variantes o derivados de los mismos descritos en la presente memoria también pueden describirse o especificarse en términos de su reactividad cruzada. Tal como se usa en la presente memoria, el término "reactividad cruzada" se refiere a la capacidad de un anticuerpo, específico para un antígeno, de reaccionar con un segundo antígeno; una medida de la relación entre dos sustancias antigénicas diferentes. Así, un anticuerpo tiene reactividad cruzada si se une a un epítipo distinto al que indujo su formación. El epítipo con reactividad cruzada contiene generalmente muchas de las mismas características estructurales complementarias que el epítipo inductor, y en algunos casos, en la práctica puede encajar mejor que el original.

Por ejemplo, algunos anticuerpos tienen cierto grado de reactividad cruzada, de manera que se unen con epítopos no idénticos pero relacionados, por ejemplo, epítopos con al menos el 95 %, al menos el 90 %, al menos el 85 %, al menos el 80 %, al menos el 75 %, al menos el 70 %, al menos el 65 %, al menos el 60 %, al menos el 55 % y al menos el 50 % de identidad (calculado usando procedimientos conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria) con un epítipo de referencia. Puede decirse que un anticuerpo tiene una reactividad cruzada escasa o nula si no se une a epítopos con menos del 95 %, menos del 90 %, menos del 85 %, menos del 80 %, menos del 75 %, menos del 70 %, menos del 65 %, menos del 60 %, menos del 55 % y menos del 50 % de identidad (calculado usando procedimientos conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria) con un epítipo de referencia. Un anticuerpo puede considerarse "altamente específico" para un cierto epítipo, si no se une a ningún otro análogo, ortólogo u homólogo de ese epítipo.

Los anticuerpos de neutralización o fragmentos de unión a antígenos, variantes o derivados de los mismos descritos en la presente memoria también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión a un polipéptido. Por ejemplo, un anticuerpo de neutralización de JCV puede unirse a un péptido JCV (por ejemplo, un péptido VP1) con una constante de disociación o Kd inferior a 10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, 10^{-13} M, 10^{-14} M o 10^{-15} M.

Los anticuerpos de neutralización o fragmentos de unión a antígenos, variantes o derivados de los mismos descritos en la presente memoria pueden ser "multiespecíficos", por ejemplo, biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad, lo que significa que reconocen y se unen a dos o más epítopos diferentes presentes en uno o más antígenos diferentes (por ejemplo, proteínas) al mismo tiempo. Así, el hecho de que un anticuerpo de neutralización sea "monoespecífico" o "multiespecífico", por ejemplo, "biespecífico", se refiere al número de epítopos diferentes con los que reacciona un polipéptido de unión. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para epítopos diferentes de un polipéptido diana descrito en la presente memoria o pueden ser específicos para un polipéptido diana así como para un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o un material de soporte sólido.

Humanización:

En algunas realizaciones, un anticuerpo animal (por ejemplo, anticuerpo de ratón) puede modificarse, por ejemplo, intercambiando la región Fc por una región Fc de una especie diferente (por ejemplo, por una región Fc humana). En algunas realizaciones, pueden realizarse también uno o más cambios de humanización (por ejemplo, en una o más de las regiones marco del anticuerpo).

En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden diseñarse por ingeniería mediante sustitución parcial de las regiones marco y cambios de secuencias. En algunas realizaciones, las CDR se obtienen de un anticuerpo de una clase diferente y/o una especie diferente que las regiones marco. En algunas realizaciones, un anticuerpo diseñado por ingeniería contiene una o más CDR "donadoras" de un anticuerpo no humano de especificidad conocida que se injertan en una región marco de cadena pesada o ligera humana. Puede no ser necesario sustituir todas las CDR por las CDR completas de la región variable donadora para transferir la capacidad de unión a antígeno de un dominio variable a otro. Por el contrario, puede ser necesario solo transferir aquellos residuos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión diana. Dadas las explicaciones expuestas, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 6.180.370, entrará claramente dentro de la competencia de los expertos en la materia, ya sea realizando experimentación rutinaria o por prueba y error para obtener un anticuerpo funcional humanizado o diseñado por ingeniería.

El documento EP 239 400 (Winter y col.) describe la alteración de anticuerpos por sustitución (dentro de una región variable dada) de sus regiones de determinación de complementariedad (CDR) para una especie por los de otra. Se ha predicho que los anticuerpos con sustitución en CDR tienen menor probabilidad de desencadenar una respuesta

- inmunitaria en los seres humanos en comparación con los auténticos anticuerpos quiméricos dado que los anticuerpos con sustitución de CDR contienen considerablemente menos componentes no humanos (Riechmann y col., 1988, Nature 332, 323-327; Verhoeven y col., 1988, Science 239, 1534-1536). Normalmente, las CDR de un anticuerpo murino sustituido en las regiones correspondientes en un anticuerpo humano usando tecnología de ácidos nucleicos recombinantes para producir secuencias que codifican el anticuerpo sustituido deseado. Pueden añadirse segmentos génicos de la región constante humana del isotipo deseado (normalmente gamma I para CH y kappa para CL) y los genes de cadena pesada y ligera humanizados se coexpresan en células de mamíferos para producir anticuerpo humanizado soluble.
- 10 Queen y col., 1989 Proc Natl Acad Sci USA. Dec; 86(24): 10029-33 y el documento WO 90/07861 han descrito un procedimiento que incluye elegir regiones marco V humanas por análisis informático para una homología óptima de secuencias de proteínas en la región marco V del anticuerpo murino original, y modelizar la estructura terciaria de la región V murina para visualizar residuos de aminoácidos marco que probablemente interactuarán con las CDR murinas. Estos residuos de aminoácidos murinos se superponen a continuación en el marco humano homólogo.
- 15 Véanse también las patentes de EE.UU. nº 5.693.762; 5.693.761; 5.585.089; y 5.530.101. Tempest y col., 1991, Biotechnology 9, 266-271) usan, como estándar, las regiones marco V obtenidas de las cadenas pesadas y ligeras NEWM y REI respectivamente para injerto de CDR sin introducción radical de residuos de ratón. Una ventaja de usar el planteamiento de Tempest y col. para construir anticuerpos humanizados basados en NEWM y REI es que las estructuras tridimensionales de las regiones variables NEWM y REI son conocidas por cristalografía de rayos X y así pueden modelizarse interacciones específicas entre CDR y residuos de regiones marco V. Sin embargo, debe observarse que los planteamientos similares pueden basarse en una o más de otras estructuras de anticuerpos conocidas (por ejemplo, basándose en una o más estructuras Fab). En algunas realizaciones, puede usarse un marco de línea germinal humano.
- 25 En algunas realizaciones, una región VH de ratón (por ejemplo, el anticuerpo 18C9 descrito en la presente memoria) tiene un marco 1 y/o un marco 3 que es más corto que las regiones marco humanas correspondientes. En algunas realizaciones, pueden realizarse delecciones de aminoácidos correspondientes en variantes humanizadas de anticuerpos de ratón. En algunas realizaciones, estas delecciones no tienen un gran efecto en la afinidad.
- 30 Los anticuerpos no humanos pueden modificarse para incluir sustituciones que insertan secuencias de inmunoglobulinas humanas, por ejemplo, residuos de aminoácidos humanos de consenso en posiciones específicas, por ejemplo, en una o más de las siguientes posiciones (preferentemente al menos cinco, diez, doce o todas): (en la FR del dominio variable de la cadena ligera) 4L, 35L, 36L, 38L, 43L, 44L, 58L, 46L, 62L, 63L, 64L, 65L, 66L, 67L, 68L, 69L, 70L, 71L, 73L, 85L, 87L, 98L y/o (en la FR del dominio variable de la cadena pesada) 2H, 4H, 24H, 36H, 37H, 39H, 43H, 45H, 49H, 58H, 60H, 67H, 68H, 69H, 70H, 73H, 74H, 75H, 78H, 91H, 92H, 93H, y/o 103H (de acuerdo con la numeración de Kabat). Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.407.213.

Producción de anticuerpos:

- 40 Los anticuerpos monoclonales de neutralización de JCV (por ejemplo, monoclonales de conejo, ratón, quiméricos, humanizados, totalmente humanos, etc.) pueden producirse usando técnicas conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, los anticuerpos totalmente humanos pueden producirse, por ejemplo, usando esplenocitos humanos cebados *in vitro*, tal como se describe en Boerner y col., 1991, J. Immunol., 147, 86-95. Pueden prepararse por clonación del repertorio tal como se describe en Persson y col., 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 88: 2432-2436 o en Huang y Stollar, 1991, J. Immunol. Methods 141, 227-236. Documento EE.UU. 5.798.230. También pueden usarse bibliotecas de fagos humanos no inmunizados grandes para aislar anticuerpos de alta afinidad que pueden desarrollarse como sustancias terapéuticas humanas usando tecnología de fagos estándar (véase, por ejemplo, Vaughan y col., 1996 Nat Biotechnol. Mar; 14(3):309-14; Hoogenboom y col. (1998) Immunotechnology 4:1-20; y Hoogenboom y col. (2000) Immunol Today 2:371-8; solicitud de patente publicada de EE.UU. nº 2003-0232333). Los anticuerpos pueden producirse en células procarióticas o eucarióticas. En algunas realizaciones, los anticuerpos (por ejemplo, scFv) se expresan en una célula de levadura tal como Pichia (véase, por ejemplo, Powers y col. (2001) J Immunol Methods. 251: 123-35), Hanseula o Saccharomyces.

- En algunas realizaciones, los anticuerpos, especialmente los anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, IgG, se producen en células de mamífero. Las células hospedadoras de mamífero de ejemplo para expresión recombinante incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (que incluyen células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, usadas en un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, tal como se describe en Kaufman y Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), líneas de células linfocitarias, por ejemplo, células de mieloma NSO y células SP2, células COS, K562 y una célula de un animal transgénico, por ejemplo, un mamífero transgénico. Por ejemplo, puede usarse una célula epitelial mamaria.

Además de la o las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el dominio de inmunoglobulinas, los vectores de expresión recombinantes pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células hospedadoras en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Los genes marcadores seleccionables de ejemplo incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células hospedadoras dhfr con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para selección de G418).

10 En un sistema de ejemplo para la expresión recombinante de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de longitud completa o una porción de unión a antígeno del mismo), se introduce un vector de expresión recombinante que codifica el anticuerpo cadena pesada y el anticuerpo cadena ligera en células dhfr-CHO mediante transfección mediada por fosfato de calcio. En el vector de expresión recombinante, los genes de cadena pesada y ligera del anticuerpo están ligados cada uno operativamente con elementos reguladores intensificadores/promotores (por ejemplo, derivados de SV40, CMV, adenovirus y similares, tales como un elemento regulador intensificador de CMV/promotor de AdMLP o un elemento regulador intensificador de SV40/promotor de AdMLP) para impulsar altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante transporta además un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector usando selección/amplificación de metotrexato. Las células hospedadoras transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo y se recupera el anticuerpo intacto del medio de cultivo. Se usan técnicas de biología estándar para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospedadoras, seleccionar transformantes, cultivar las células hospedadoras y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Por ejemplo, algunos anticuerpos pueden aislarse por cromatografía de afinidad con una Proteína A o Proteína G. En algunas realizaciones, las regiones variables de anticuerpo de ratón se clonaron y se expresaron en células CHO.

25 Los anticuerpos también pueden incluir modificaciones, por ejemplo, modificaciones que alteran la función Fc, por ejemplo, para reducir o eliminar la interacción con un receptor Fc o con Clq, o ambos. Por ejemplo, la región constante de IgG1 humana puede mutarse en uno o más residuos, por ejemplo, uno o más de los residuos 234 y 237, por ejemplo, de acuerdo con la numeración de la patente de EE.UU. nº 5.648.260. Otras modificaciones de ejemplo incluyen las descritas en la patente de EE.UU. nº 5.648.260.

Para algunos anticuerpos que incluyen un dominio Fc, el sistema de producción de anticuerpos puede diseñarse para sintetizar anticuerpos en los que la región Fc está glucosilada. Por ejemplo, el dominio Fc de moléculas IgG está glucosilado en asparagina 297 en el dominio CH2. Esta asparagina es el lugar de modificación con oligosacáridos de tipo biantenarico. Esta glucosilación participa en funciones efectoras mediadas por receptores Fcγ y Clq de complemento (Burton y Woof (1992) Adv. Immunol. 51: 1-84; Jefferis y col. (1998) Immunol. Rev. 163:59-76). El dominio Fc puede producirse en un sistema de expresión de mamíferos que glucosila de forma apropiada el residuo correspondiente a asparagina 297. El dominio Fc también puede incluir otras modificaciones postraduccionales eucarióticas.

40 Los anticuerpos también pueden producirse por un animal transgénico. Por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.849.992 describe un procedimiento para expresar un anticuerpo en la glándula mamaria de un mamífero transgénico. Se construye un transgén que incluye un promotor específico de la leche y ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo de interés y una secuencia señal para secreción. La leche producida por las hembras de dichos mamíferos transgénicos incluye, secretado en las mismas, el anticuerpo de interés. El anticuerpo puede purificarse a partir de la leche, o para algunas aplicaciones, usarse directamente.

En ciertos aspectos, en lugar de humanizar un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno existente de una especie diferente, puede inmunizarse un animal que contiene células que producen inmunoglobulinas que tienen loci de inmunoglobulinas naturales, humanos o parcialmente humanos. En algunos aspectos, el animal no humano incluye al menos una parte de un gen de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, es posible diseñar cepas animales que son deficientes en producción de anticuerpos animales usando grandes fragmentos de los loci de Ig humanos. Usando la tecnología de hibridoma, pueden producirse y seleccionarse anticuerpos monoclonales específicos de antígenos derivados de los genes con la especificidad deseada.

55 **Aplicaciones terapéuticas:**

En algunos aspectos, un anticuerpo de neutralización descrito en la presente memoria puede administrarse a un sujeto que está sometiéndose a una terapia con un fármaco inmunosupresor. En algunos aspectos, un anticuerpo de neutralización de JCV puede usarse para prevenir el desarrollo o la progresión de LMP en un sujeto que está

sometiéndose a un tratamiento para esclerosis múltiple (EM). Por ejemplo, un sujeto que se somete a tratamiento con natalizumab o un anticuerpo de unión a VLA-4 relacionado puede ser candidato para tratamiento con un anticuerpo de neutralización de JCV.

- 5 El natalizumab y los anticuerpos de unión a VLA-4 relacionados se describen, por ejemplo, en los documentos US-5.840.299. Los AcM 21.6 y HP 1/2 son anticuerpos monoclonales murinos de ejemplo que se unen a VLA-4. El natalizumab es una versión humanizada del AcM murino 21.6 (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.840.299). Se ha descrito también una versión humanizada de HP1/2 (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.602.503). Se describen varios anticuerpos monoclonales de unión a VLA-4 adicionales, tales como HP2/1, HP2/4, 10 L25 y P4C2, (por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 6.602.503; Sanchez-Madrid y col., 1986 Eur. J. Immunol, 16: 1343-1349; Hemler y col., 1987 J. Biol. Chem. 2: 11478-11485; Issekutz y Wykretowicz, 1991, J. Immunol, 147: 109 (TA-2 mab); Pulido y col., 1991 J. Biol. Chem., 266(16): 10241-10245; y la patente de EE.UU. nº 5.888.507). Muchos anticuerpos de unión a VLA-4 útiles interaccionan con VLA-4 en las células, por ejemplo, linfocitos, pero no provocan agregación celular. Sin embargo, se ha observado que otros anticuerpos de unión anti-VLA-4 provocan dicha 15 agregación. HP1/2 no provoca agregación celular. El AcM HP1/2 (Sanchez-Madrid y col., 1986 Eur. J. Immunol., 16: 1343-1349) tiene una potencia extraordinariamente alta, bloquea la interacción de VLA-4 con VCAM1 y fibronectina y tiene la especificidad para el epítipo B en VLA-4. Este anticuerpo y otros anticuerpos específicos del epítipo B (como los anticuerpos de unión a epítopos B1 o B2; Pulido y col., 1991 J. Biol. Chem., 266(16): 10241-10245) representan una clase de anticuerpos de unión a VLA-4 útiles.

- 20 En algunos aspectos, el sujeto es un ser humano. En algunos aspectos, el sujeto es un animal no humano, por ejemplo, un mamífero no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo, cabra, etc.).

Aplicaciones:

- 25 En algunos aspectos, un anticuerpo de neutralización puede administrarse a un sujeto para prevenir o tratar una infección por el virus JC, y/o para prevenir o tratar LMP.

- En algunos aspectos, los aspectos de la descripción se refieren a composiciones de anticuerpos que inhiben la actividad del virus JC, por ejemplo, que inhiben uno o más de entre proliferación vírica (por ejemplo, replicación vírica), velocidad de mutación e infectividad. En algunos aspectos, dichas composiciones pueden usarse para tratar o suprimir condiciones asociadas con la actividad del virus JC en sujetos que están infectados por un virus JC, o para reducir el riesgo de infección con el virus JC. Dichas composiciones pueden usarse para prevenir la infección vírica JCV, para prevenir un aumento en la actividad vírica de JCV (por ejemplo, infección activa por JCV del 30 encéfalo), para prevenir la proliferación de virus JC, para prevenir síntomas asociados con la infección vírica, para tratar a un sujeto infectado con un virus JC o para tratar a un sujeto en riesgo de infección con un virus JC, o para tratar a un sujeto que ha desarrollado una enfermedad o condición asociada con la infección por un virus JC (por ejemplo, LMP). Las composiciones de la descripción también pueden administrarse a un sujeto en riesgo de una infección vírica o en riesgo de un aumento en la actividad vírica (por ejemplo, proliferación vírica, por ejemplo en el 40 encéfalo o el SNC), con independencia de si se sabe que el sujeto se ha expuesto en realidad o ha sido infectado por el virus.

- En algunos aspectos, puede administrarse una o más composiciones de anticuerpos a sujetos que tienen un sistema inmunitario deprimido. Debe observarse que el sistema inmunitario de un sujeto puede estar deprimido 45 debido al tratamiento con un agente terapéutico inmunosupresor y/o debido a una enfermedad o condición que incide en el sistema inmunitario. En algunos aspectos, puede administrarse una o más composiciones de anticuerpos a un sujeto que está en riesgo de LMP debido a un sistema inmunitario deprimido, con independencia de si se sabe que el sujeto está infectado con JCV o se sabe que ha estado expuesto a JCV. En consecuencia, las composiciones de la descripción pueden administrarse a sujetos que están recibiendo un tratamiento 50 inmunosupresor para una enfermedad o condición. En algunos aspectos, las composiciones de la invención pueden administrarse a pacientes con esclerosis múltiple (EM) que están siendo tratados con uno o más agentes inmunosupresores (por ejemplo, natalizumab). Sin embargo, en algunos aspectos, las composiciones de la descripción pueden administrarse a sujetos que tienen un sistema inmunitario debilitado causado por una enfermedad o condición en sí, en lugar de por un tratamiento inmunosupresor. Por ejemplo, los sujetos infectados 55 con un patógeno inmunodepresor (por ejemplo, un virus tal como HIV) pueden recibir tratamiento con una o más composiciones de anticuerpos descritas en la presente memoria.

- Debe observarse que si bien no es necesario conocer el estado de JCV de un sujeto, puede ser útil conocer el estado en algunos aspectos. En algunos aspectos, puede llevarse un seguimiento de la eficacia de dicho tratamiento 60 o terapia detectando y/o vigilando la presencia de JCV en un sujeto.

En algunos aspectos, puede administrarse una o más composiciones de anticuerpos a un sujeto antes, durante, y/o después de que el sujeto reciba una terapia de inmunomodulación (por ejemplo, un tratamiento que inhibe el sistema inmunitario del sujeto). En consecuencia, en algunos aspectos pueden administrarse uno o más compuestos descritos en la presente memoria efectivos para inhibir la replicación del virus JC a un sujeto antes de iniciar una terapia de inmunomodulación. Por ejemplo, puede iniciarse un régimen terapéutico de una o más composiciones de la descripción antes del tratamiento inmunomodulador contra una enfermedad o como preparación para un trasplante para prevenir o reducir cualquier riesgo de replicación o proliferación de virus JC asociada con el tratamiento inmunomodulador.

En algunos aspectos, puede administrarse o más composiciones de la descripción en solitario o en combinación con otras composiciones descritas en la presente memoria o junto con otros agentes terapéuticos (por ejemplo, uno o más agentes terapéuticos inmunosupresores). Las composiciones de la descripción pueden proporcionarse (por ejemplo, administrarse) en preparaciones farmacéuticas. Las composiciones de la descripción pueden proporcionarse en kits.

En algunos aspectos, en un sujeto que está siendo tratado (o que va a iniciar un tratamiento) con un agente inmunosupresor se prueba si existe uno o varios indicios de infección por JCV. Si se detecta uno o más indicios de infección por JCV, puede evaluarse en el sujeto la presencia de una o más variantes de JCV asociadas con LMP tal como se describe en la presente memoria. Si no se detectan indicios de JCV, puede llevarse un seguimiento del sujeto con el tiempo, por ejemplo, cada 4 semanas, cada mes, cada tres meses, cada 4 meses, cada 6 meses o cada 12 meses, para detectar la presencia de cualquier indicio de infección por JCV. Si se detecta una infección por JCV, puede someterse al sujeto a una evaluación adicional sobre la presencia de una o más variantes de JCV. Si se detecta una variante de JCV asociada con un aumento del riesgo de LMP, puede llevarse un seguimiento adicional del sujeto para detectar cualquier signo temprano de LMP y/o puede modificarse el régimen terapéutico tal como se describe en más detalle en la presente memoria.

En algunos aspectos, un anticuerpo de neutralización puede ser útil para ralentizar la progresión de una condición (por ejemplo, LMP) que está asociada con una infección por JCV. En algunos aspectos, el retraso en la progresión de LMP u otra condición asociada con JCV permite que la respuesta inmunitaria del sujeto luche contra la infección por JCV. Por ejemplo, si a un sujeto que se somete a inmunoterapia o a tratamiento con un fármaco que es inmunosupresor, se le diagnostica que tiene una infección por JCV, y/o que tiene uno o más signos o síntomas de LMP (por ejemplo, LMP en fase temprana), entonces puede tratarse al sujeto administrando una o más composiciones de anticuerpos descritas en la presente memoria. En algunos aspectos, el tratamiento con la inmunoterapia o fármaco que es inmunosupresor se reduce o se interrumpe durante el tiempo en que se administra el anticuerpo de neutralización de JCV. Esto puede permitir que el sistema inmunitario del sujeto se recupere y ayudar a luchar contra la infección por JCV o contra la progresión de la enfermedad.

Ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos:

En algunos aspectos, se usó la siguiente secuencia de ácidos nucleicos para codificar una cadena pesada del anticuerpo de neutralización:

```
Atggacttcgggtgagcttggttttcctgtcctaattttaaaaggtgtccagtgtgaagtgcagctgcagcagtcggccctgagctggt
Gaaacctggcgctccatgaagatcagctgcaaggcctcggctactcctcaccggctacaccctgacctgggtgaaacagtccca
Cggcaagaacctggactggtcggcctgatcaaccctaccacggcgccacccggtacaaccagaagtcaagggaagggccacc
Ctgacctggacaagtctctccaccgcctacatggaactgctgctcctgacctcggaggtcggcctgtactactgcgccagac
Tgggctactacgccacggcgacgagtactctgactactggggccaggggcaccaccctgacagtgtcctccgctctaccaagggc
Cctccgtgtcctctggcccccctccagcaagtccacctgtggcgccgacccgctgtgggtgctggtgcaaggactacttccccg
Aaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggtgcacacctcccggtgtcctacagtctcaggactctactc
Cctcagcagcgtggtgacctgcccctcagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacacca
Aggtggacaagaaagttgagcccaaatctgtgacaagactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgt
Cagtctctcttccccccaaacccaaggacacctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtgagctgagcca
Cgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatccaagacaaagccggcgaggagcagtag
Aaagcagctacgggtgtggtcagctcctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaac
Aaagcctccagccccctcagaaaaccatctcaaaagcgaaggcgagccccgagaaccaaggtgtacaccctgcccccct
Cccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaaggcttctatccagcgacatcgccgtggagtgaggag
Agcaatgggcagccggagacaactacaagaccagcctcccggtgttgactccgacggctccttctctacagcaagctcacc
gtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacagcagaagag
cctctccctgtctcccggt (SEQ ID NO: 73)
```

En algunos aspectos, se usó la siguiente secuencia de ácidos nucleicos para codificar una cadena ligera del anticuerpo de neutralización:

5 Atgagggtcccgctcagctcctgggctccttctgctctggctcctggagccagatgtgacatcgtgatgaccagtcccacaagtt
Catgtccacctccgtggcgaccgggtgtccatcacatgcaaggcctcccagagcgtgggcaccgccgtggcctggatcagcaga
Agcccgccagtcaccaagctgtgatctactgggctccaccagacacacggcggtgccgacagattcaccgggtccagatcc
Ggcaccgacttcacctgaccttccaacgtgcagtcaggacgtggcgactacttctgccagcagtactcctcctaccagca
Ccttcggcgaggcgccaagctgaaatccggcgtagcgtggctgcacatctgttctatcttcccgccatctgatgagcagttgaaa
10 Tctggaactgcctctgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgccctccaatcg
Ggtaactcccaggagagtgacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagca
gactacgagaaacaaaagctacgctgcgaagtcacccatcaggcgctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggaga
gtgt (SEQ ID NO: 74).

15 **Líneas celulares útiles para expresar los anticuerpos:**

En algunos aspectos, uno o más anticuerpos de neutralización pueden expresarse en células CHO o HEK293. Sin embargo, puede usarse cualquier línea celular adecuada.

20 **Vías de administración:**

En algunos aspectos, la descripción proporciona procedimientos de inhibición de replicación vírica, comprendiendo los procedimientos la puesta en contacto de una célula que comprende un virus JC con una composición de anticuerpos.

25 En ciertos aspectos, un anticuerpo o preparación de anticuerpos se administra por vía intravenosa. En otros aspectos, un anticuerpo o preparación de anticuerpos se administra por vía oral. Las vías de administración alternativas incluyen administraciones sublingual, intramuscular y transdérmica. En consecuencia, las preparaciones de la presente invención pueden suministrarse por vía oral, parenteral, tópica o rectal. Naturalmente, se suministran
30 en formas adecuadas para cada vía de administración.

Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" tal como se usan en la presente memoria significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular,
35 intraorbitaria, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intrarraquídea y intraesternal.

Las frases "administración sistémica", "administrado sistémicamente", "administración periférica" y "administrado periféricamente" tal como se usan en la presente memoria significan la administración de un anticuerpo, fármaco u
40 otro material de forma diferente a directamente en el sistema nervioso central, de manera que entra en el sistema del paciente y, así, está sujeto a metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

Las composiciones de anticuerpos pueden administrarse a seres humanos y otros animales para terapia por cualquier vía de administración adecuada. Los niveles de dosificación reales de anticuerpos de neutralización
45 pueden ajustarse para obtener una cantidad que sea efectiva para alcanzar la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración en particular, sin ser tóxica para el paciente.

El nivel de dosificación seleccionado dependerá de distintos factores que incluyen la actividad del anticuerpo en particular, la velocidad de aclaramiento del anticuerpo, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o
50 materiales usados en combinación con el anticuerpo en particular, la edad, el sexo, el peso, la condición, el estado general de salud y la historia médica anterior del paciente sometido a tratamiento, y factores similares bien conocidos en las técnicas de medicina.

Un médico o veterinario que sea un experto en la materia puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad efectiva de la composición de anticuerpos requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría iniciar las dosis de
55 las composiciones de anticuerpos en niveles inferiores al requerido para conseguir el efecto terapéutico deseado y después aumentar gradualmente la dosificación hasta que se alcance el efecto deseado.

En algunos aspectos, se proporciona una composición de anticuerpos de la descripción a un sujeto de forma
60 crónica. Los tratamientos crónicos incluyen cualquier forma de administración repetida durante un periodo de tiempo

extenso, tal como administraciones repetidas durante uno o más meses, entre un mes y un año, uno o más años, o más. En algunos aspectos, un tratamiento crónico implica la administración de composiciones de anticuerpos de la descripción de forma repetida durante la vida del sujeto. En ciertos aspectos, los tratamientos crónicos implican administraciones regulares, por ejemplo una o más veces al día, una o más veces por semana, o una o más veces al mes. En general, una dosis adecuada, por ejemplo una dosis diaria de composiciones de anticuerpos de la descripción, será aquella cantidad que sea la dosis mínima efectiva para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis efectiva dependerá en general de los factores descritos anteriormente. En algunos aspectos, pueden usarse al menos 0,5-1 mg/kg. Sin embargo, pueden usarse cantidades superiores o inferiores. En algunos aspectos, una dosis efectiva de un anticuerpo descrito en la presente memoria puede ser de aproximadamente 100 mg/kg o más.

En algunos aspectos, pueden usarse de 300 a 600 mg/kg.

Las preparaciones de anticuerpos de neutralización pueden formularse para su administración en cualquier forma conveniente para su uso en la medicina humana o veterinaria, por analogía con otros anticuerpos. En algunos aspectos, los aspectos de la descripción se refieren también a un procedimiento de preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un sujeto, por ejemplo, para tratar o prevenir una infección por JVC, o para inhibir la replicación o proliferación de JCV. Dichas preparaciones pueden usarse para el tratamiento profiláctico de un sujeto en riesgo o con sospecha de tener una infección por JCV o que está en riesgo para LMP (por ejemplo, para tratamiento de un sujeto antes, durante y/o después de que el sujeto reciba una terapia inmunomoduladora). En consecuencia, puede usarse una o más composiciones de anticuerpos descritas en la presente memoria que modulan la replicación o proliferación de virus de ADN tal como se describe en la presente memoria para la preparación de un medicamento para su uso en cualquiera de los procedimientos de tratamiento descritos en la presente memoria. En algunos aspectos, la descripción proporciona el uso de una o más composiciones de anticuerpos de la descripción (por ejemplo, identificadas como inhibidoras de la replicación de JCV) para la fabricación de un medicamento o producto farmacéutico para tratar a un mamífero (por ejemplo, un ser humano) que tiene uno o más síntomas, o está en riesgo de infección, replicación y/o proliferación de JCV (por ejemplo, uno o más síntomas de actividad de JCV). En consecuencia, los aspectos de la descripción se refieren al uso de una o más composiciones de anticuerpos descritas en la presente memoria para la preparación de un medicamento para tratar o prevenir LMP en un sujeto.

En consecuencia, la descripción se refiere también a una o más composiciones de anticuerpos descritas en la presente memoria para su uso como medicamento. La descripción se refiere también a una o más de estas composiciones de anticuerpos para su uso en procedimientos descritos en la presente memoria, por ejemplo en procedimientos para inhibir la replicación de JCV, o para tratar o prevenir una enfermedad asociada con la replicación o proliferación de JCV (por ejemplo, en sujetos que serán, están siendo y/o han sido tratados con al menos una composición inmunomoduladora).

Aplicaciones diagnósticas y kits:

En algunos aspectos, los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden usarse como reactivos de detección para diagnóstico *in vivo*, y/o acoplarse a reactivos de colorantes de contraste para radiología.

En algunos aspectos, los aspectos de la descripción incluyen el uso de anticuerpos anti-JCV inmovilizados o no inmovilizados (por ejemplo, anticuerpos de unión a VP-1) como fracciones de detección para evaluar la presencia y/o el nivel de JCV en una muestra. Los ensayos de detección pueden incluir el uso de una o más fracciones de detección marcadas (por ejemplo, un anticuerpo de unión a VP-1 que contiene o se une a una etiqueta detectable). Una etiqueta detectable se define como cualquier fracción que puede detectarse usando un ensayo. Los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos funcionales de la invención pueden acoplarse a agentes de marcado específicos para detectar la unión de acuerdo con procedimientos de acoplamiento estándar. Puede usarse una extensa variedad de etiquetas detectables, tales como las que proporcionan detección directa (por ejemplo, una etiqueta radiactiva, un fluoróforo, [por ejemplo, Proteína Fluorescente Verde (GFP), Proteína Fluorescente Roja (RFP), etc.], un cromóforo, una etiqueta densa óptica o electrónica, etc.) o detección indirecta (por ejemplo, una marca enzimática tal como peroxidasa de rábano picante, etc.). Los ejemplos no limitativos de etiquetas detectables que se han unido o incorporado a anticuerpos incluyen: enzimas, radioetiquetas, etiquetas fluorescentes, moléculas fosforescentes, moléculas quimioluminiscentes, cromóforos, moléculas luminiscentes, moléculas de fotoafinidad y partículas o ligandos coloreados tales como biotina, etc. En algunos aspectos, los procedimientos de detección de la descripción pueden incluir procedimientos de electroquimioluminiscencia (ECL).

Pueden usarse diversos procedimientos para detectar una etiqueta, dependiendo de la naturaleza de la etiqueta y otros componentes de ensayo. Las etiquetas pueden detectarse directamente a través de densidad óptica o electrónica, emisiones radiactivas, transferencias de energía no radiativa, etc., o detectarse indirectamente con

conjugados de anticuerpos, conjugados de estreptavidina-biotina, etc. En la técnica se conocen muchas etiquetas detectables adicionales, así como procedimientos para su fijación a anticuerpos.

Los anticuerpos marcados pueden ser anticuerpos que se usan *in vitro*, por ejemplo, en un inmunoensayo tal como ELISA. Dichos anticuerpos marcados de forma detectable pueden ser anticuerpos que tienen una etiqueta detectable incorporada en el anticuerpo o pueden ser anticuerpos que están unidos a un ligando de unión secundario y/o a una enzima (una marca de enzima) que generarán un producto detectable (por ejemplo, coloreado) al contacto con un sustrato cromógeno. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, ureasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa de hidrógeno (rábano picante) o glucosa oxidasa. Los ejemplos de ligandos de unión secundarios adecuados incluyen, pero no se limitan a, compuestos de biotina y/o avidina y estreptavidina. El uso de dichas etiquetas es bien conocido para los expertos en la materia y se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241.

En la técnica se conocen numerosos procedimientos para la fijación o conjugación de un anticuerpo a su etiqueta detectable. Un procedimiento de fijación puede incluir el uso de un complejo de quelato metálico que emplea, por ejemplo, un agente de quelación orgánico tal como anhídrido dietilentriaminopentaacético (DTPA); ácido etilentriaminotetraacético; N-cloro-p-toluensulfonamida; y/o tetracloro-3-alfa-6-alfa-difenilglucourilo-3 unido al anticuerpo (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.472.509 y 4.938.948). Los anticuerpos monoclonales también pueden hacerse reaccionar con una enzima en presencia de un agente de copulación tal como glutaraldehído o peryodato. Los anticuerpos pueden marcarse con marcadores de fluoresceína en presencia de estos agentes de copulación o por reacción con un isotiocianato. En otros aspectos, los anticuerpos pueden marcarse por derivatización, por ejemplo, por introducción selectiva de grupos sulfhidrilo en la región Fc del anticuerpo, usando condiciones de reacción que no alteran el sitio de reconocimiento del anticuerpo.

La detección de una etiqueta detectable en un ensayo de la descripción se refiere también en la presente memoria como detección de la "señal". Los procedimientos para detectar la señal en un inmunoensayo son bien conocidos en la técnica. En algunos aspectos, una señal de ensayo puede detectarse usando un lector de placas multipocillos (por ejemplo, un lector de microplacas) para evaluar la cantidad y/o localización de una señal. La detección de la señal puede ser una detección óptica u otros medios de detección adecuados para detectar una etiqueta detectable usada en la descripción.

La presente invención se ilustra adicionalmente con los siguientes ejemplos, que en ningún modo deben entenderse como limitativos.

35 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Anticuerpo y secuencias CDR

Se generó un panel de candidatos de anticuerpos monoclonales de neutralización por técnicas de inmunización estándar en ratones. Después de cribado de ~300 clones individuales, se seleccionaron 6 clones como posibles anticuerpos de bloqueo. Se ha desarrollado un anticuerpo adicional por su capacidad de reconocer preferentemente la variante JCV-VP1 S269F.

Los anticuerpos se designaron como 14G8, 16H5, 8D6, 18C9, 32A5 y 34C6. El aglutinante específico de S269F, 1B1, tiene preferencia por S269F pero tiene también cierta afinidad por S269. El anticuerpo 8D6 reconoce JCV VLP con alta afinidad pero es un pobre neutralizador de infectividad. A continuación se ofrece una lista de las secuencias de los anticuerpos de ratón 14G8, 16H5, 18C9 y 34C6.

Los anticuerpos 18C9, 16H5, 14G8 y 1B1 tienen sitios de desamidación predichos en la segunda CDR de sus cadenas pesadas. Estos sitios se diseñaron a partir de los genes para el anticuerpo 18C9 con las siguientes sustituciones: cadena pesada N55Q, N55S, N55D, N55H, N55T, N55A, N55L y G56A, G56V, G56P. El mutante de desamidación N55H retuvo la reactividad para todas las partículas de tipo virus JC, lo que indica que no se perdió la unión. Todos los demás mutantes de desamidación produjeron algunos cambios en la unión a las variantes VP1 PML-génicas comunes

El anticuerpo 18C9 tiene una cisteína libre en la tercera CDR de la cadena ligera. Estos sitios se diseñaron a partir de los genes para el anticuerpo 18C9 con las siguientes sustituciones: cadena ligera C96S, C96A, C96L. La cisteína libre se eliminó sucesivamente por la sustitución C96S.

En los experimentos presentados en los ejemplos siguientes, las secuencias monoclonales de ratón se acoplaron

con Fc humano, para producir un anticuerpo quimérico. Los experimentos se realizaron en anticuerpos sin secuencias señal (resaltadas)

Anticuerpo 14G8

5

SEQ ID NO: 1 14G8 cadena pesada

MVDIPMGCSWVILFLLSGTAGVHSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKESHGKNLDWIGLINPYNGGTRYDQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARSHHYASGDEYFDYWGQGTTTLTVSS

SEQ ID NO: 2 14G8 cadena pesada sin secuencia señal

10 EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKESHGKNLDWIGLINPYNGGTRYDQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARSHHYASGDEYFDYWGQGTTTLTVSS

SEQ ID NO: 3 14G8 cadena ligera

MESHTQVFVYMLLWLSGVEGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGTAVAWYQQKPGQSPKVLIIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPLTFGAGTKLELK

15 **SEQ ID NO: 4 14G8 cadena ligera sin secuencia señal**

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGTAVAWYQQKPGQSPKVLIIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPLTFGAGTKLELK

Anticuerpo 16H5

20 **SEQ ID NO: 5 16H5 cadena pesada**

MECSWVMLFLLSGTAGVHSEVHLQQSGPELVKPGASMKISCRISGYSFTGYTMNWVKQTHGKILEWIGLINPYNGGVTYNQKFKGKATLTVDKSSSTTYLELLSLTSEDSAVYYCARSHNYGTGDEYFDYWGQGTTTLTVSS

SEQ ID NO: 6 16H5 cadena pesada sin secuencia señal

25 EVHLQQSGPELVKPGASMKISCRISGYSFTGYTMNWVKQTHGKILEWIGLINPYNGGVTYNQKFKGKATLTVDKSSSTTYLELLSLTSEDSAVYYCARSHNYGTGDEYFDYWGQGTTTLTVSS

SEQ ID NO: 7 16H5 cadena ligera

MESQTQVFIIYMLLWLSGVEGDIVMTQSHKFMSTSLGDRVNITCKASLAVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRPTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLTDFCQQYSSYPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO: 8 16H5 cadena ligera sin secuencia señal

30 DIVMTQSHKFMSTSLGDRVNITCKASLAVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRPTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLTDFCQQYSSYPLTFGAGTKLELK

Anticuerpo 18C9 (las secuencias CDR están subrayadas)

SEQ ID NO: 9 18C9 cadena pesada

35 MLEWSWVILFLLSGTAGVHSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYNNGGTRYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTTLTVSS

SEQ ID NO: 10 18C9 cadena pesada sin secuencia señal

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYNNGGTRYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTTLTVSS

40 **SEQ ID NO: 11 18C9 cadena ligera**

MKSHTQVFIIYMLLWLSGVEGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSRSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPCTFGGGAKLEIR

SEQ ID NO: 12 18C9 cadena ligera sin secuencia señal

45 DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSRSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPCTFGGGAKLEIR

Anticuerpo 34C6 (las secuencias CDR están subrayadas)

SEQ ID NO: 13 34C6 cadena pesada

EVQLQQSGTVLARPASVKMSCKASAYTFTRYWMHWVKQRPQGLEWIGAIYPGNSDTTYNQKFKGKAKLTAVTS
TSTAYMELSSLTNEDSAVYYCTKKGVRYALDYWGQGTSTVTVSS

5

SEQ ID NO: 14 34C6 cadena ligera

METDTLLLWVLLLVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGNSFVHWYQKPGQPPKLLIYRA
SNLESGIPARFSGSGSRDTFTLTINPVEADDVATYYCLQSNEDPMYTFGGGKLEIK

SEQ ID NO: 15 34C6 cadena ligera sin secuencia señal

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGNSFVHWYQKPGQPPKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRDTF
TLTINPVEADDVATYYCLQSNEDPMYTFGGGKLEIK

10

Secuencias de anticuerpo 18C9 modificadas (las secuencias CDR están subrayadas; la mutación está resaltada y subrayada)

15 **SEQ ID NO: 16 18C9 cadena pesada, N55S:**

MDFGLSLVFLVLLILKGVCQEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYSG
GTRYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 17 18C9 cadena pesada, N55S: sin secuencia señal

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYSGGTRYNQKFKGKATLTVDKS
SSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTLTVSS

20

SEQ ID NO: 18 18C9 cadena pesada, N55Q:

MDFGLSLVFLVLLILKGVCQEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYQG
GTRYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 19 18C9 cadena pesada, N55Q: sin secuencia señal

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYQGGTRYNQKFKGKATLTVDKS
SSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTLTVSS

25

SEQ ID NO: 20 18C9 cadena pesada, N55D:

MDFGLSLVFLVLLILKGVCQEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYDG
GTRYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTLTVSS

30

SEQ ID NO: 21 18C9 cadena pesada, N55D: sin secuencia señal

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYDGGTRYNQKFKGKATLTVDKS
SSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 22 18C9 cadena pesada, N55H:

MDFGLSLVFLVLLILKGVCQEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYHG
GTRYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTLTVSS

35

SEQ ID NO: 23 18C9 cadena pesada, N55H: sin secuencia señal

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYHGGTRYNQKFKGKATLTVDKS
SSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 24 18C9 cadena pesada, N55T:

MDFGLSLVFLVLLILKGVCQEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYTG
GTRYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTLTVSS

40

SEQ ID NO: 25 18C9 cadena pesada, N55T: sin secuencia señal

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYTGGTRYNQKFKGKATLTVDKS
SSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 26 18C9 cadena pesada, N55A:

MDFGLSLVFLVLILKGVQCEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYA
GTRYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTLTVSS

5 SEQ ID NO: 27 18C9 cadena pesada, N55A: sin secuencia señal

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYAGGTRYNQKFKGKATLTVDKS
SSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 28 18C9 cadena pesada, N55L:

MDFGLSLVFLVLILKGVQCEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYLG
GTRYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTLTVSS

10

SEQ ID NO: 29 18C9 cadena pesada, N55L: sin secuencia señal

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYLGGTRYNQKFKGKATLTVDKS
SSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 30 18C9 cadena pesada, N55X:

MDFGLSLVFLVLILKGVQCEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYXG
GTRYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTLTVSS

15

SEQ ID NO: 31 18C9 cadena pesada, N55X: sin secuencia señal

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYXGGTRYNQKFKGKATLTVDKS
SSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTLTVSS

20 SEQ ID NO: 32 18C9 cadena pesada, G56A:

MDFGLSLVFLVLILKGVQCEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYNA
GTRYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 33 18C9 cadena pesada, G56A: sin secuencia señal

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYNAGTRYNQKFKGKATLTVDKS
SSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTLTVSS

25

SEQ ID NO: 34 18C9 cadena pesada, G56V:

MDFGLSLVFLVLILKGVQCEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYNV
GTRYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 35 18C9 cadena pesada, G56V: sin secuencia señal

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYNVGTRYNQKFKGKATLTVDKS
SSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTLTVSS

30

SEQ ID NO: 36 18C9 cadena pesada, G56P:

MDFGLSLVFLVLILKGVQCEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYNP
GTRYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTLTVSS

35 SEQ ID NO: 37 18C9 cadena pesada, G56P: sin secuencia señal

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYNPGTRYNQKFKGKATLTVDKS
SSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 38 18C9 cadena pesada, G56X:

MDFGLSLVFLVLILKGVQCEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYNX
GTRYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGGYATGDEYFDYWGQGTTLTVSS

40

SEQ ID NO: 39 18C9 cadena pesada, G56X: sin secuencia señal

EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTLTWVKQSHGKNLDWIGLINPYNXGTRYNQKFKGKATLTVDKS
SSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARLGYYATGDEYFDYWGQGTTTLTVSS

SEQ ID NO: 40 18C9 cadena ligera C96L:

MRVPAQLLGLLLWLPGARCDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRH
TGVPDRFTGSRSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYP~~L~~TFGGGAKLEIR

5

SEQ ID NO: 41 18C9 cadena ligera C96L: sin secuencia señal

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSRSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYP~~L~~TFGGGAKLEIR

SEQ ID NO: 42 18C9 cadena ligera C96S:

MRVPAQLLGLLLWLPGARCDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRH
TGVPDRFTGSRSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYP~~S~~TFGGGAKLEIR

10

SEQ ID NO: 43 18C9 cadena ligera C96S: sin secuencia señal

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSRSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYP~~S~~TFGGGAKLEIR

SEQ ID NO: 44 18C9 cadena ligera C96A:

MRVPAQLLGLLLWLPGARCDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRH
TGVPDRFTGSRSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYP~~A~~TFGGGAKLEIR

SEQ ID NO: 45 18C9 cadena ligera C96A: sin secuencia señal

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSRSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYP~~A~~TFGGGAKLEIR

20

SEQ ID NO: 46 18C9 cadena ligera, C96X:

MRVPAQLLGLLLWLPGARCDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRH
TGVPDRFTGSRSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYP~~X~~TFGGGAKLEIR

SEQ ID NO: 47 18C9 cadena ligera, C96X: sin secuencia señal

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSRSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYP~~X~~TFGGGAKLEIR

25

Secuencias CDR 18C9

SEQ ID NO: 48 CDR1 de cadena pesada

30 GYTLT

SEQ ID NO: 49 CDR2 de cadena pesada

LINPYNGGTRYNQKFKG

SEQ ID NO: 50 CDR2 de cadena pesada N55S

LINPYSGGTRYNQKFKG

SEQ ID NO: 51 CDR2 de cadena pesada N55Q

LINPYQGGTRYNQKFKG

40

SEQ ID NO: 52 CDR2 de cadena pesada N55D

LINPYDGGTRYNQKFKG

SEQ ID NO: 53 CDR2 de cadena pesada N55H

45 LINPYHGGTRYNQKFKG

SEQ ID NO: 54 CDR2 de cadena pesada N55T

LINPYTGGTRYNQKFKG

SEQ ID NO: 55 CDR2 de cadena pesada N55A
LINPYAGGTRYNQKFKG

5 **SEQ ID NO: 56 CDR2 de cadena pesada N55L**
LINPYLGGTRYNQKFKG

SEQ ID NO: 57 CDR2 de cadena pesada N55X
LINPYXGGTRYNQKFKG

10 **SEQ ID NO: 58 CDR2 de cadena pesada G56A**
LINPYNGGTRYNQKFKG

SEQ ID NO: 59 CDR2 de cadena pesada G56V
15 LINPYNAGTRYNQKFKG

SEQ ID NO: 60 CDR2 de cadena pesada G56P
LINPYNVGTRYNQKFKG

20 **SEQ ID NO: 61 CDR2 de cadena pesada G56X**
LINPYNPGTRYNQKFKG

SEQ ID NO: 62 CDR2 de cadena pesada N55X G56X
LINPYXXGTRYNQKFKG

25 **SEQ ID NO: 63 CDR3 de cadena pesada**
LGYYATGDEYFDY

SEQ ID NO: 64 CDR1 de cadena ligera
30 KASQDVGTA

SEQ ID NO: 65 CDR2 de cadena ligera
WASTRHT

35 **SEQ ID NO: 66 CDR3 de cadena ligera**
QQYSSYPCT

SEQ ID NO: 67 CDR3 de cadena ligera C96L
QQYSSYPLT

40 **SEQ ID NO: 68 CDR3 de cadena ligera C96S**
QQYSSYPST

SEQ ID NO: 69 CDR3 de cadena ligera C96A
45 QQYSSYPAT

SEQ ID NO: 70 CDR3 de cadena ligera C96X
QQYSSYPXT

50 Ejemplo 2: Unión a JCV-VP1 del anticuerpo CH-P18C9 (= 18C9 quimérico que incluye SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12) determinado por ELISA

Se evaluó la unión del anticuerpo CH-P18C9 (= 18C9 quimérico que incluye SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12) a una serie de JCV-VP1 de tipo silvestre y mutantes usando ELISA. Los resultados se resumen en la Figura 1.

55 Ejemplo 3: Unión a JCV-VP1 del anticuerpo CH-P18C9 (= 18C9 quimérico que incluye SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12) determinado por Biacore

Se evaluó la unión del anticuerpo CH-P18C9 (= 18C9 quimérico que incluye SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12) a una serie de JCV-VP1 de tipo silvestre y mutantes usando Biacore. Los resultados se resumen en la Figura 2.

60

Ejemplo 4: Ensayo de infectividad con virus JCV-VP1 mutantes

Se evaluó la capacidad de anticuerpo chi-18C9 (= 18C9 quimérico que incluye SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12) para suprimir la infectividad de los mutantes de JCV-VP1. Las condiciones de ensayo se proporcionan en la Figura 4 y la Figura 5. La lectura de los experimentos se realizó por Western blots. Los resultados de los Western blots se muestran en las Figuras 6-7 (exposición regular) y las Figuras 8-9 (sobreexposición).

Ejemplo 5: Generación de mutantes de desamidación del anticuerpo 18C9

En la Figura 10 se proporciona una visión general de la generación de los mutantes de desamidación del anticuerpo 18C9. La purificación de los mutantes se resume en la Figura 11.

Ejemplo 6: Unión de mutantes de desamidación del anticuerpo 18C9 a virus JCV-VP1 mutantes

Se evaluó por ELISA la capacidad de mutantes de desamidación de anticuerpo 18C9 de unirse a los distintos mutantes de JCV-VP1. Se proporciona una visión general del ensayo ELISA en la Figura 12. El resultado de ELISA de la unión de los mutantes de desamidación del anticuerpo 18C9 a JCV-VP1 WT y los diversos mutantes de JCV-VP1 se proporcionan en la Figura 13. En la Figura 14 se proporcionan las condiciones de un ensayo adicional. En la Figura 15 se proporcionan los valores EC_{50} (en nM).

Equivalentes

La memoria descriptiva precedente se considera suficiente para permitir que un experto en la técnica ponga en práctica la invención. La presente invención no debe limitarse en su alcance a los ejemplos proporcionados, dado que los ejemplos pretenden servir de simple ilustración de un aspecto de la invención y otras realizaciones funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. Para los expertos de la técnica serán evidentes diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en la presente memoria a partir de la descripción anterior que se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal de neutralización del virus JC aislado contra la proteína de cápside JCV VP1 (JCV-VP1), donde dicho anticuerpo monoclonal comprende:

un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos CDR1 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una secuencia de aminoácidos CDR2 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 y una secuencia de aminoácidos CDR3 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; y

un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos CDR1 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, una secuencia de aminoácidos CDR2 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y una secuencia de aminoácidos CDR3 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66.

2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, donde al menos una secuencia de aminoácidos de región de marco del dominio variable de cadena pesada tiene una identidad de al menos el 90 % con al menos una secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia de aminoácidos de región de marco de dominio variable de cadena pesada que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada que:

(i) tiene al menos una identidad del 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; o

(ii) es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

4. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, donde al menos una secuencia de aminoácidos de región de marco del dominio variable de cadena ligera tiene una identidad de al menos el 90% con al menos una secuencia de aminoácidos correspondiente de la secuencia de aminoácidos de región de marco de dominio variable de cadena pesada que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

5. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera que:

(i) tiene al menos una identidad del 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; o

(ii) es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

7. Un anticuerpo monoclonal de neutralización del virus JC aislado contra la proteína de cápside JCV VP1 (JCV-VP1), en el que dicho anticuerpo monoclonal comprende:

un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos CDR1 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, una secuencia de aminoácidos CDR2 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53 y una secuencia de aminoácidos CDR3 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; y

un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos CDR1 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, una secuencia de aminoácidos CDR2 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y una secuencia de aminoácidos CDR3 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68.

8. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7, en el que al menos una secuencia de aminoácidos de región de marco del dominio variable de cadena pesada que tiene una identidad de al menos el 90% con al menos una secuencia de aminoácidos correspondiente de región de marco de una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23.

9. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7, donde dicho anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada que:

- 5 (i) tiene al menos una identidad del 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; o
(ii) es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23.

10. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7, donde al menos una secuencia de aminoácidos de región de marco del dominio variable de cadena ligera tiene una identidad de al menos el 90% con al menos una secuencia de aminoácidos correspondiente de región de marco de una secuencia de aminoácidos de dominio
10 variable de cadena ligera que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43.

11. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7, donde dicho anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera que:

- 15 (i) tiene al menos una identidad del 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43; o
(ii) es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43.

12. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7, donde dicho anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de
20 SEQ ID NO: 23 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43.

13. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
25

14. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo comprende una región Fc de IgG1.

15. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en un procedimiento de tratamiento de un sujeto que tiene uno o más signos o síntomas de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), o que tiene LMP.
30

16. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 15, donde el anticuerpo cruza la barrera hematoencefálica.
35

17. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 15 o 16, donde el tratamiento produce una reducción en la carga viral, una mejora en la puntuación EDSS, una mejora en la puntuación Karnofsky, una mejora en la exploración de RM o una mejora en la cognición.

40 18. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, donde el sujeto está sometándose, o se ha sometido, a tratamiento con inmunoterapia.

19. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, donde el sujeto está inmunodeprimido.
45

FIG. 1

ELISA de afinidad candidata

	CH-P18C9
Mad-1	≤0,1
Tipo 3	≤0,1
Tipo 1B	≤0,1
Tipo 2A	≤0,1
269F-tipo 3	≤0,1
269Y-tipo 3	0,4
269F-tipo 1B	≤0,1
S267F	≤0,1
N265D	≤0,1
Q271H	≤0,1
D66H	≤0,1
K60E	0,6
K60N	≤0,1
L55F	≤0,1

Datos de afinidad de Biacore

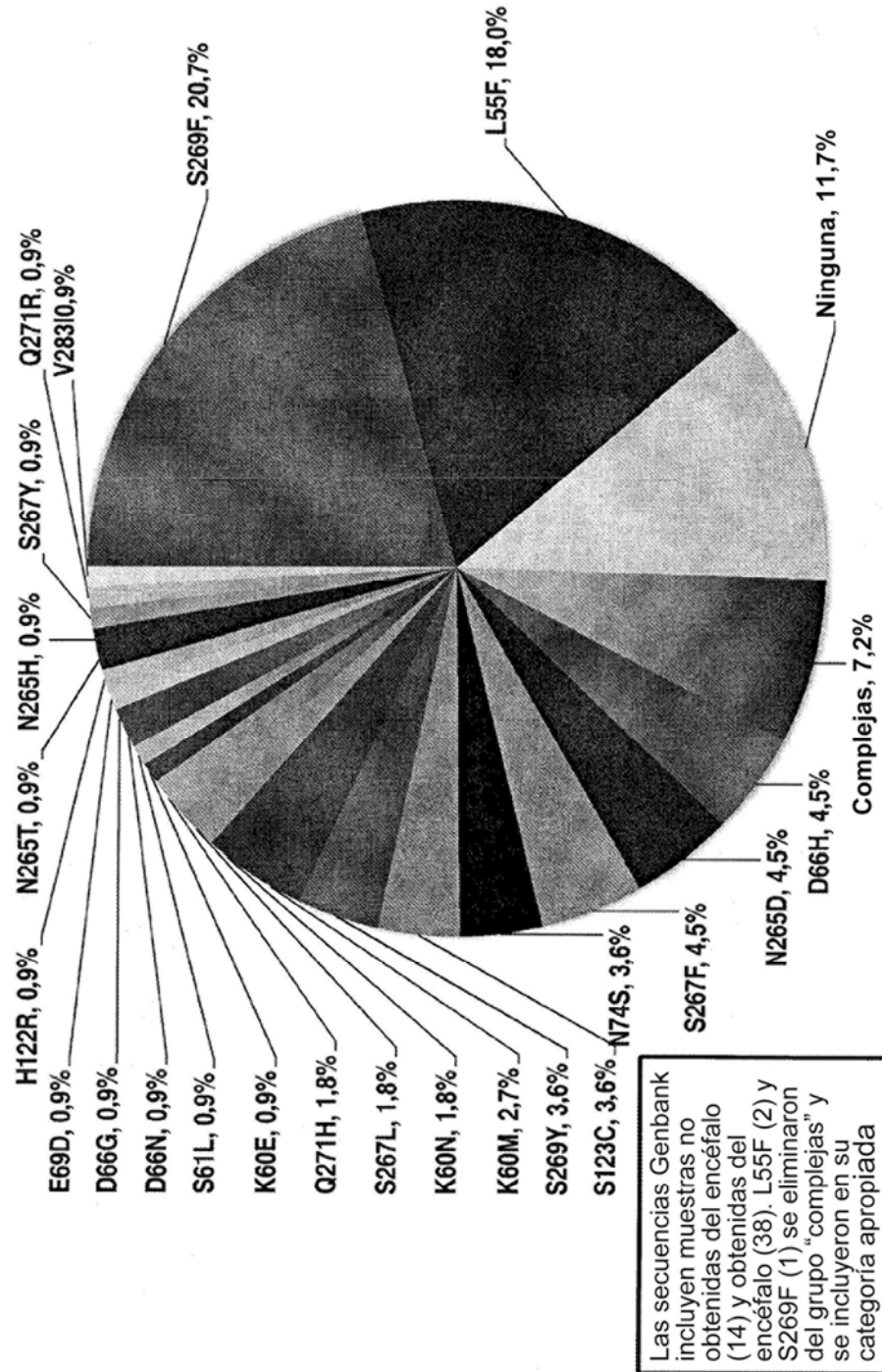
K _D (nM)	Tipo 1B		Tipo 2A*		MAD-1		Tipo 3		Tipo 3		Tipo 3		Tipo 3		Tipo 3	
	wt	AcM	Fab	AcM	Fab	AcM	Fab	AcM	Fab	AcM	Fab	AcM	Fab	AcM	Fab	AcM
P18C9			0,7	0,03	0,1	0,02	0,2	0,01	>60	≤0,04	>1450	≤0,6				

FIG. 2

K _D (nM)	Tipo 3		Tipo 3		Tipo 3		Tipo 3		Tipo 3		Tipo 3		Tipo 3		Tipo 1B	
	D66H	AcM	Fab	AcM	Fab	AcM	K60E	AcM	Fab	AcM	N265D	AcM	Fab	AcM	S267F	AcM
P18C9	0,3	≤0,0 1	0,9	≤0,0 5	0,1	0,1										

Frecuencia de mutaciones combinadas de JCV VP1

52 Genbank, 19 Tysabri, 40 VIH italiano



Preparaciones de virus

- Purificaciones actuales:
 - Tx benzonasa/neuraminidasa de CM
 - Centrifugado a través de amortiguador de sacarosa al 40%
 - Resuspensión: 0,01x volumen original en HBSS++
 - Virus
 - 2Awt
 - 2A L55F • 2A N265D
 - 2A S269F • 2A S269Y
 - 2A K60E • 2A K60M
 - 2A S267F • 2A Q271F**
 - 2A D66H** • 2A S61P**
 - MAD1 (1Av wt)
 - Todo preparado a partir de material post-infección excepto ** que se obtuvieron post-transfección
- Todas las valoraciones (Geq) evaluadas por qPCR

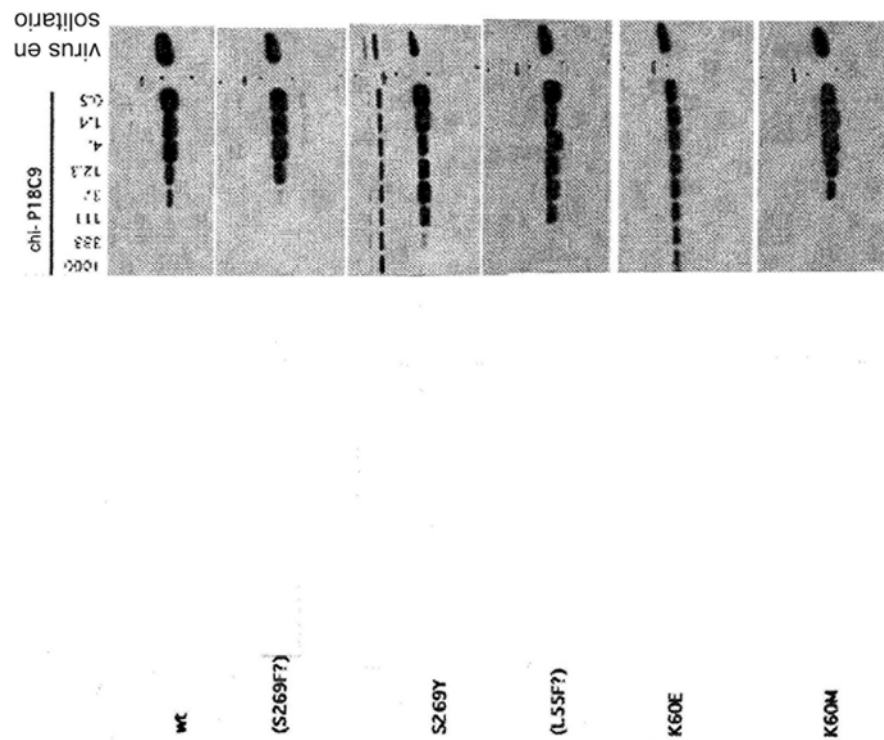
FIG. 4

Infectividad de mutante vírico: ensayo de bloqueo de AcM

- Diseño:
 - Células 293ft: formato 96w, 15e3 células/pocillo; placas recubiertas Fn @ t= (-18 h)
 - 12 virus
 - Andamiaje 2A: wt, S269F, L55T, S269Y, K60E, K60M; S267F; N265D; Q271F; D66H; S61P
 - MAD1
 - 1,5e9GEq/pocillo (MOI=1e5)
 - AcM
 - chi-18C9
 - Diluciones en serie 3 veces: 1000-0,46 ng/ml conc final
 - 2 replicados condición ea por placa; 1 virus x 3 AcM por placa
 - Virus pre-inc + AcM 90 min TA (volumen bajo, 35 µl)
 - Desarrollo en presencia de AcM (@conc apropiada, fv 100 µl)
 - Aspirar medio y sustituir por medio con suplemento de AcM @ 3 dpi, 7 dpi
 - Recogida @ 11 dpi
 - aspirar medio, lavar PBS-Ca++, lisar en 100 µl/pocillo de tampón RIPA modificado (Y. Gao)
- Lectura inicial:
 - Western (parte de 1 replicado condición ea)
 - Todas las muestras 7,5 µl de lisado/pocillo
 - Detectar con PAB597 1 µg/ml O/N 4°C >> DaM-HRP 1:50K 90 min >> detectar reactivo Pierce SuperSignal West Dura ECL

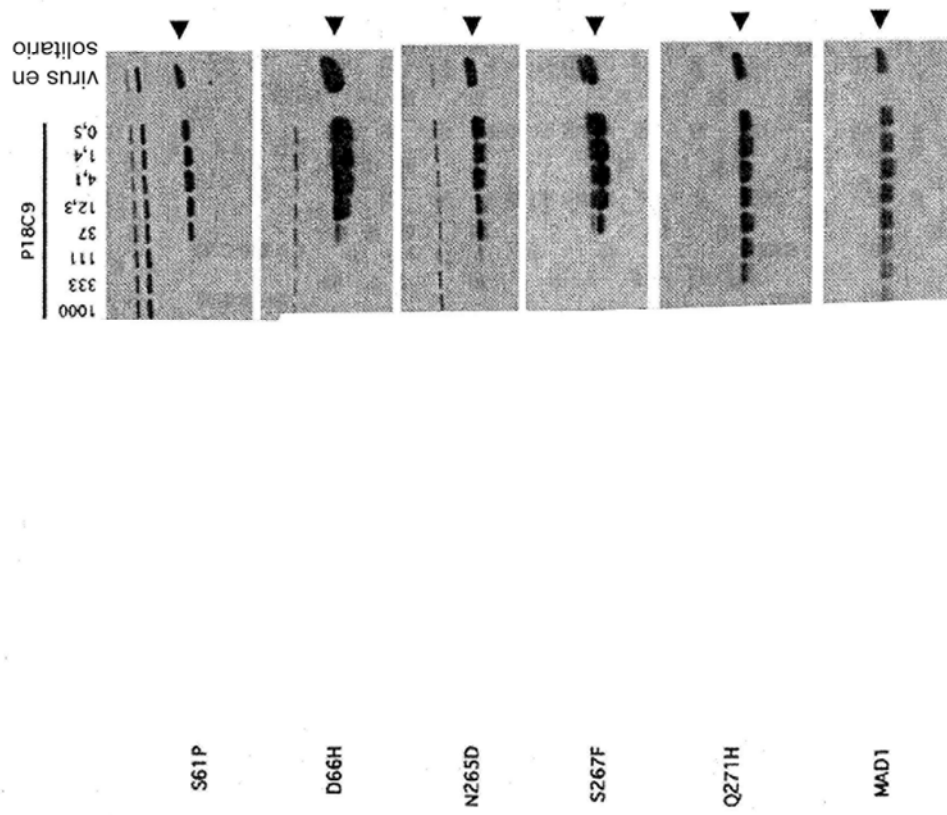
Virus mutante – AcM protección frente a infección de 293ft: 2Awt, S269F, S269Y, L55F, K60E, K60M

FIG. 6



Virus mutante – protección de AcM frente a infección de 293ft: S61P, D66H, N265D, S267F, Q271H, MAD1wt

FIG. 7



Virus mutante – protección de AcM: chi-18C9 frente a infección por VP1 mutante de 293ft

FIG. 8

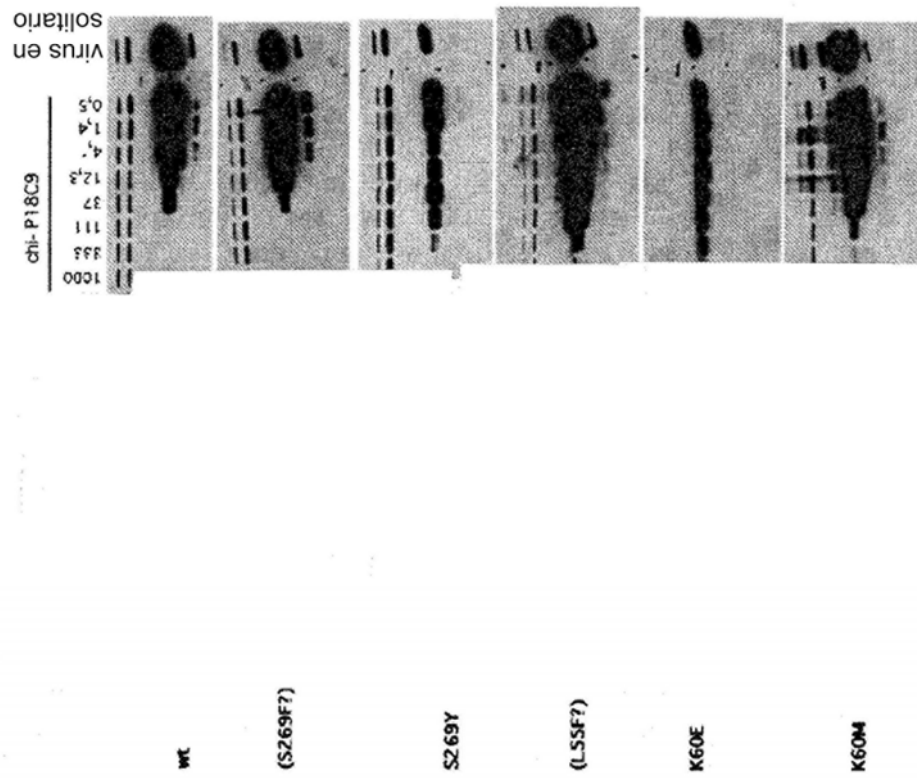
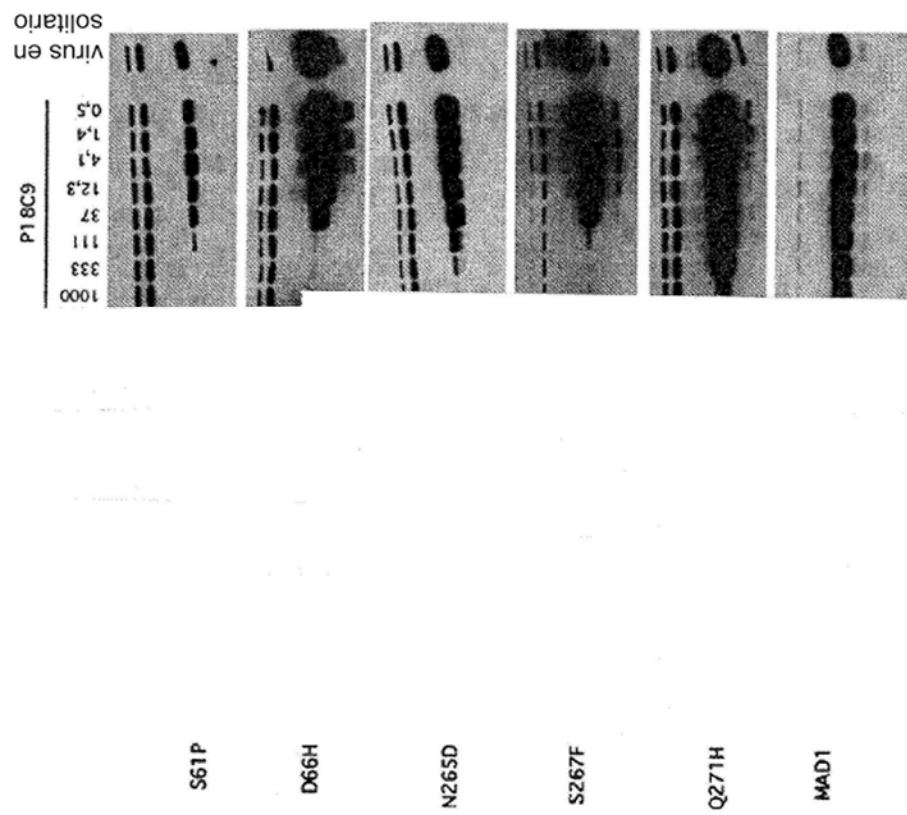


FIG. 9

Virus mutante – protección de AcM frente a infección de
293ft: S61P, D66H, N265D, S267F, Q271H, MAD1wt



Mutantes de desamidación de chP18– revisión/resumen

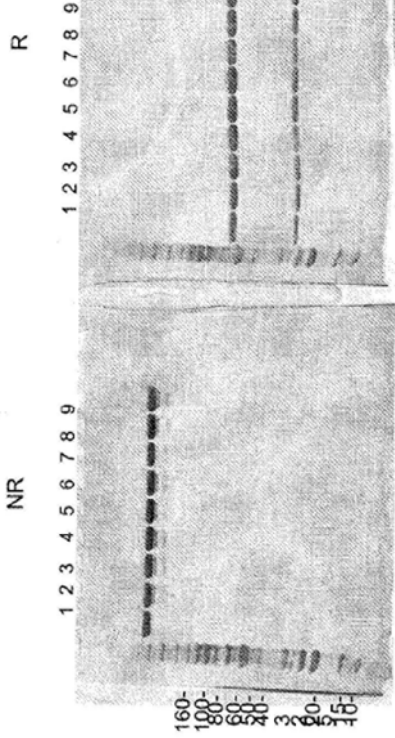
- 18C9 monoclonal anti-VP1 murino seleccionado como candidato de reserva basado en cobertura de mutante VP1
- Dos “banderas rojas” abordadas en el contexto de la molécula quimérica: LC-C96 y HC N55G56
- Primera ronda: combinaciones de WT, N55S y N55Q con WT, C96S, C96A y C96L expresadas en LC, purificadas y probadas por ELISA. Las mejores fueron N55S/C96S – sin embargo perdida afinidad 2-3 veces en 269Y (3) y K60E (3), lo que lleva a valores por encima del umbral mínimo de 0,3 nM
- Ronda 2: N55D, H, A, L, T y G56V, P y A emparejadas se purificaron por LC-C96S y se probaron en un subconjunto de mutantes; a partir de estos resultados, N55N (WT) N55D, N55H y N55S incluidas en gran ELISA final

FIG. 10

Purificación de mutantes de desamidación ch18C9 de ronda 2

- Una porción de sup transitorios (50 o 100 ml) purificados en proteína A y SEC debido a un enorme aumento en la unión observado con ch18C9 WT agregado (AKTA Express, modo 2D)
- De 5 a 20 mg de cada uno recuperado de los dos sup (no relevante para nivel de expresión – carga pA cercana a la capacidad y corte máximo conservador en SEC)

SDS-PAGE:



10 µl de cada 1:5 dilución
NR – con NEM
R – con DTT

1	ch18C9 N55D
2	ch18C9 N55H
3	ch18C9 N55A
4	ch18C9 G56V
5	ch18C9 N55 (wt)
6	ch18C9 G56P
7	ch18C9 N55L
8	ch18C9 N55T
9	ch18C9 G56A

SEC analítica:

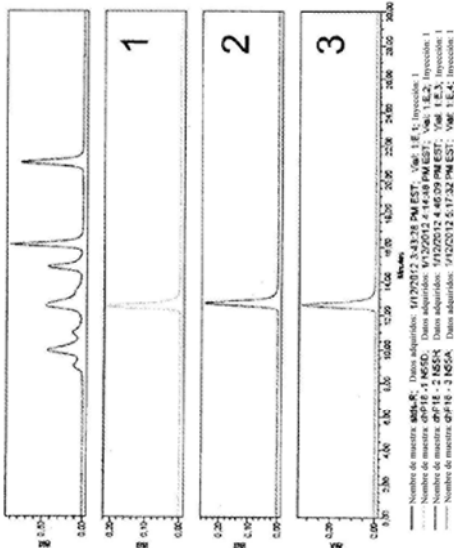
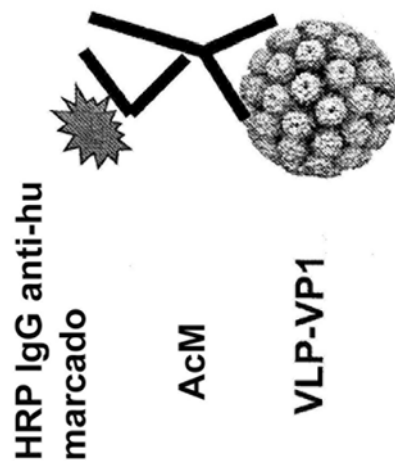


FIG. 11

ELISA de unión a VLP – versión robot



- Cubrimiento durante toda la noche a 4°C con 0,2 µg/ml de VLP diluido en D-PBS, 50 µl/pocillo
- 2 lavados con PBST
- Bloquear 1 h a TA con caseína BB
- 2 lavados con PBST
- 1 h reacción con diluciones 3 veces, placas duplicadas
- 5 lavados con PBST
- 1 h reacción con anti-HuIgG Fc de cabra específico – F(ab')₂ – HRP (Jackson #109-036-098) 1:10 k
- 5 lavados con PBST
- 4 minutos revelado de color con TMB
- Interrumpir con H₂SO₄ 1 N

FIG. 12

Resultados ELISA – Mutantes de desamidación ch18C9 ronda 2
Selecccionar VLP WT y mutante

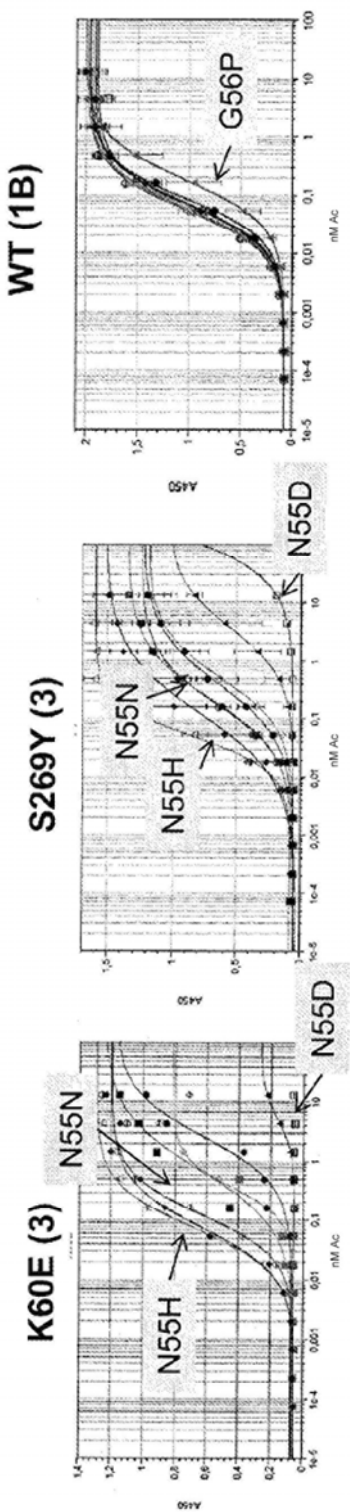


FIG. 13

		EC ₅₀ nM					
Mutación HC	K60E (3)	269F (1B)	269Y (3)	K60N (3)	WT (2A)	WT (1B)	267F (3)
WT(C96S)	0,12	0,1	0,18	0,06	0,05	0,05	0,04
N55S	0,36	0,22	0,5	0,1	0,06	0,07	0,05
N55D	NB	>>10	NB	>>10	0,06	0,06	0,06
N55H	0,07	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04
N55A	>10	LP	0,6	0,08			
N55L	>10	LP	1	0,3			
N55T	2,58	0,14	0,4	0,08	0,08	0,09	0,06
G56V	0,07	0,08	0,12	0,05	0,06	0,07	0,04
G56P	5,27	2,16	3,58	0,5	0,19	0,18	0,09
G56A	0,7	0,1	0,22	0,06	0,05	0,06	0,04

ELISA final:
seleccionar variantes ch18C9 en todas VLP disponibles

- Variantes ch18C9: HC-WT/LC-WT
 HC-WT/LC-C96S
 HC-N55D/LC-C96S
 HC-N55H/LC-C96S
 HC-N55S/LC-C96S
- VLP (todo preparado con procedimiento TFF/TMAE salvo * que indica procedimiento UC/TMAE híbrido):
WT (1A) L55F(1B) N265D (1B)* S269F (1B)
WT (1B) L55F (3) N265D (3) S269F (3)
WT (2A) K60E (3) S267F (1B) S269Y (1B)*
WT (2B) K60N (3) S267F (3) S269Y (3)
WT (3) D66H (1B) Q271H (3)
WT (Mad-1) D66H (3)
- Diluciones 3 veces empezando en 2 µg/ml (12 puntos) placas duplicadas
- 10 o 20 placas al día; algunas VLP duplicadas de un día al siguiente para demostrar la reproducibilidad

FIG. 14

FIG. 15

EC₅₀ ELISA, nM

	ch18C9 WT/WT	ch18C9 WT/C96S	ch18C9 N55D/C96S	ch18C9 N55H/C96S	ch18C9 N55S/C96S
WT (1A)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
WT (1B)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
WT (2A)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
WT (2B)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
WT (3)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
WT (Mad-1)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
L55F (1B)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
L55F (3)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
K60E (3)	0,21	0,44	4,55	<0,1	1,43
K60N (3)	<0,1	<0,1	>>10	<0,1	<0,1
D66H (1B)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
D66H (3)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
N265D (1B)	<0,1	<0,1	>10	<0,1	<0,1
N265D (3)	<0,1	<0,1	1	<0,1	<0,1
S267F (1B)	<0,1	<0,1	1,9	<0,1	<0,1
S267F (3)	<0,1	<0,1	0,12	<0,1	<0,1
S269F (1B)	<0,1	<0,1	>10	<0,1	0,2
S269F (3)	<0,1	<0,1	>10	<0,1	<0,1
S269Y (1B)	2,2	>10	nb	<0,1	>>10
S269Y (3)	0,3	0,4	>>10	<0,1	1,5
Q271H (3)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1