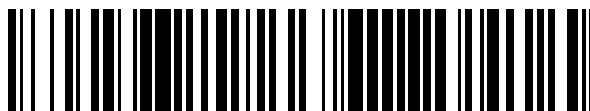


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 757**

51 Int. Cl.:

C07K 14/24

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013** **PCT/US2013/031842**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013** **WO13142299**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013** **E 13765090 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019** **EP 2828284**

54 Título: **Anticuerpos neutralizantes de JCV**

30 Prioridad:

20.03.2012 US 201261613214 P

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

18.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SIMON, KENNETH;
CAMERON, THOMAS;
WANG, DEPING;
ARNDT, JOSEPH;
RUSHE, MIA;
CARAVELLA, JUSTIN y
DAY, ERIC**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 731 757 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 neutralizantes de JCV

5 CAMPO DE LA INVENCION

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

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

15

Suzuki *et al.* *Virology* **286**, 100-112 (2001) investigan la distribución del receptor del virus JC utilizando, entre otros, un anticuerpo anti-JCV VP1 y tratamiento con sialidasa.

RESUMEN DE LA INVENCION

20

Con base en la descripción que está contenida en el presente documento, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal neutralizante del virus JC aislado contra la proteína de la cápside VP1 del JCV (JCV-VP1), donde dicho anticuerpo monoclonal comprende:

25

un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, una secuencia de aminoácidos de CDR2 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, y una secuencia de aminoácidos de CDR3 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, una secuencia de aminoácidos de CDR2

30

que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y una secuencia de aminoácidos de CDR3 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

35

En otro aspecto, la presente invención proporciona el anticuerpo de la invención para su uso en un método para tratar a un sujeto que tiene uno o más signos o síntomas de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), o que tiene LMP.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo derivado de conejo.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es humanizado.

40

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

En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una función efectora.

45

En algunas realizaciones, los aspectos de la invención se refieren a un anticuerpo aislado que comprende SEQ ID NO:15 (399-1 N31G) y SEQ ID NO:20 (399-h, C35A V50A).

50

En algunas realizaciones, los aspectos de la invención se refieren a un anticuerpo aislado que comprende una secuencia que tiene al menos un 80 % de homología con SEQ ID NO:15 (399-1 N31G) y una secuencia que tiene al menos un 80 % de homología con SEQ ID NO:20 (399-h, C35A V50A).

55

En algunas realizaciones, los aspectos de la invención se refieren a un anticuerpo aislado que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de homología con SEQ ID NO:15 (399-1 N31G) y una secuencia que tiene al menos un 90 % de homología con SEQ ID NO:20 (399-h, C35A V50A).

60

En algunas realizaciones, los aspectos de la invención se refieren a un anticuerpo aislado que comprende una secuencia que tiene al menos un 95 % de homología con SEQ ID NO:15 (399-1 N31G) y una secuencia que tiene al menos un 95 % de homología con SEQ ID NO:20 (399-h, C35A V50A).

60

En algunas realizaciones, los aspectos de la invención se refieren a un anticuerpo aislado que comprende una secuencia que tiene hasta 10 mutaciones en comparación con SEQ ID NO:15 (399-1 N31G) y una secuencia que tiene hasta 10 mutaciones en comparación con SEQ ID NO:20 (399-h, C35A V50A).

En algunas realizaciones, los aspectos de la invención se refieren a un anticuerpo aislado que tiene la siguiente secuencia de cadena ligera:

AFQLTQSPSSLSASVGDRVTINCQASQSIGGNLAWYQQKPGKAPKLLIYLASYLASG
VPSRFGSGSGTQFTLTVSSLQPEDFATYYCQSSYYSPNDNAFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:66);

5

y/o la siguiente secuencia de cadena pesada:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFDRNYWIAWVRQAPGKGLEWVA AISAG
GSGNTYYATWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFYSGGGYYAG

YFTLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSL
SPG

10

(SEQ ID NO:67).

En algunas realizaciones, la secuencia de señal de cadena ligera es MRVPAQLLG LLLLWLP GARC (SEQ ID NO:68).

15 En algunas realizaciones, la secuencia de señal de cadena pesada es MDFGLSWVFLVLVLKGVQC (SEQ ID NO:69).

En algunas realizaciones, los aspectos de la invención se refieren a un anticuerpo de la invención para su uso para tratar a un sujeto que tiene uno o más signos o síntomas de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP). o que tiene LMP, el método comprende administrar uno o más anticuerpos descritos en el presente documento a un sujeto
20 que tiene uno o más signos o síntomas de LMP, o que tiene LMP, en una cantidad terapéuticamente eficaz para tratar LMP.

En algunas realizaciones, el anticuerpo cruza la barrera hematoencefálica.

25 En algunas realizaciones, el tratamiento da lugar a una reducción en la carga viral, una puntuación EDSS mejorada, una puntuación de Kamofsky mejorada, un escáner IRM mejorado, o una mejora en cognición. En algunas realizaciones, el sujeto se somete, o se ha sometido, a tratamiento de inmunoterapia. En algunas realizaciones, el sujeto es inmunodeficiente.

30 La presente invención y las realizaciones de esta se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las figuras solo son ilustrativas y no se requieren para habilitar la invención descrita en el presente documento.

35

La figura 1 muestra los resultados de la capacidad de anticuerpos monoclonales derivados de conejo para neutralizar

los virus JCV y BKV en un ensayo de inhibición de la infectividad de astrocitos humanos.

La figura 2 muestra los resultados de la capacidad de anticuerpos monoclonales derivados de conejo para neutralizar los virus JCV y BKV en un ensayo de inhibición de la infectividad del epitelio tubular proximal renal humano.

5

La figura 3 proporciona una visión general de los valores EC₅₀, EC₈₀ y EC₉₀ de los anticuerpos contra JCV y BKV en varios ensayos.

La figura 4 muestra los resultados de la capacidad de anticuerpos monoclonales derivados de conejo para unirse a la proteína de tipo salvaje JCV-VP1 y a los mutantes de JCV-VP1 L55F, S269F, Q271H, K60E y D66H.

10

La figura 5 muestra los resultados de estudios de unión de los anticuerpos monoclonales de conejo 399 y de los humanizados BIIB048 (= HOLO), H0_{V50A} L2_{N31A} y H0_{V50A} L2_{N31A} a un número de JCV-VP1 de tipo salvaje y mutante utilizando ELISA.

15

La figura 6 muestra los resultados de estudios de unión de los anticuerpos humanizados BIIB048 (= HOLO) y H0_{V50A} L2_{N31A} A UN NÚMERO DE JCV-VP1 DE TIPO SALVAJE Y MUTANTE UTILIZANDO ELISA.

La figura 7 proporciona una visión general de la frecuencia de mutación combinada de JCV VP1.

20

La figura 8 muestra la capacidad del anticuerpo HOLO de suprimir la infectividad de JCV.

La figura 9 muestra una visión general de preparaciones de virus para un ensayo de infectividad.

25 La figura 10 muestra una visión general de un ensayo de infectividad mutante viral.

La figura 11 muestra una visión general de un ensayo de infectividad mutante viral como se muestra por medio de Western blot.

30 La figura 12 muestra una visión general de un ensayo de infectividad mutante viral como se muestra por medio de Western blot.

La figura 13 muestra una visión general de un ensayo de infectividad mutante viral como se muestra por medio de Western blot.

35

La figura 14 muestra una visión general de un ensayo de infectividad mutante viral como se muestra por medio de Western blot.

La figura 15 muestra una visión general de un ensayo de unión de ELISA del JCV-VLP1.

40

La figura 16 muestra una visión general de un ensayo de unión de ELISA del JCV-VLP1.

La figura 17 muestra los resultados de un ensayo de unión de ELISA del JCV-VLP1.

45 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

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

En algunos casos, los anticuerpos que se unen a la proteína de la cápside de JCV, por ejemplo, la proteína VP1 de JCV, son anticuerpos neutralizantes. En algunos casos, los anticuerpos que se unen al bolsillo de unión del ácido siálico de la proteína VP1 de JCV son anticuerpos neutralizantes. Sorprendentemente, un anticuerpo neutralizante de JCV que se une a VP1 puede ser eficaz contra dos o más variantes diferentes de JCV, incluidas las variantes que tienen uno o más cambios en la secuencia de aminoácidos en el bolsillo de unión del ácido siálico de la proteína VP1.

Un anticuerpo neutralizante puede ser útil para ayudar a prevenir, manejar y/o tratar una o más afecciones asociadas a una infección por JCV. La infección por JCV es sumamente prevalente en los seres humanos. Una infección primaria por JCV puede ocurrir de manera asintomática durante la infancia. El JCV se puede diseminar por todo el cuerpo, probablemente a través de viremia y se cree que el JCV persiste con frecuencia principalmente en el tejido cerebral y

60

renal. Mientras que la infección por JCV es asintomática en la mayoría de los sujetos, la infección puede dar lugar a afecciones más graves (como la LMP) e, incluso, muerte en algunos sujetos. Los sujetos más susceptibles a la LMP son sujetos que son inmunodeficientes (por ejemplo, pacientes con SIDA) o sujetos que se someten a un tratamiento con inmunosupresores (por ejemplo, después de un trasplante de órganos o para tratar una inflamación relacionada con una afección como la esclerosis múltiple). Los anticuerpos neutralizantes descritos en el presente documento se pueden utilizar para tratar a pacientes que están en riesgo de desarrollar una afección asociada al JCV. En algunos casos, un paciente inmunodeficiente se puede tratar con un anticuerpo neutralizante de JCV para reducir el riesgo de LMP u otra afección asociada a JCV, incluso, si el tratamiento no elimina del todo el JCV del paciente. Se debería apreciar que al inhibir la proliferación de JCV (por ejemplo, replicación y/o diseminación de JCV en un sujeto), el riesgo de afecciones asociadas a JCV se puede reducir y/o manejar como parte de un programa de tratamiento para un paciente inmunodeficiente. En algunos casos, un paciente que recibe un fármaco inmunosupresor (por ejemplo, Tysabri) se puede monitorizar para uno o más signos o síntomas de una afección asociada a JCV (por ejemplo, LMP). Si se detecta un signo o síntoma, se puede administrar un anticuerpo neutralizante de JCV. En algunos casos, el tratamiento inmunosupresor también se puede suspender o reducir para permitir que el sistema inmune del paciente se recupere y contrarreste una infección o proliferación de JCV. Sin embargo, se debería apreciar que un anticuerpo neutralizante de JCV se puede utilizar en diferentes métodos terapéuticos para tratar o prevenir infecciones por JCV y/o afecciones asociadas a JCV como las que se describen más detalladamente en el presente documento. Se debería apreciar también que un anticuerpo neutralizante de JCV se puede utilizar como reactivo, por ejemplo, un reactivo de ensayo, para detectar la presencia de una proteína o virus de JCV en una muestra. En algunos casos, los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden utilizar como reactivos de detección o de cuantificación de virus.

En algunos casos, ciertas variantes del JCV se asocian a un riesgo aumentado para una enfermedad o trastorno provocado por la infección por JCV. Por ejemplo, ciertas mutaciones en el bolsillo de unión del ácido siálico de la proteína VP1 del JCV se han asociado a un riesgo aumentado para la LMP. En algunos casos, un anticuerpo neutralizante de JCV es específico para una o más variantes del JCV. En algunos casos, un anticuerpo neutralizante de JCV se une a una pluralidad de variantes del JCV con suficiente afinidad para ser terapéuticamente eficaz contra esas variantes. En algunos casos, un anticuerpo neutralizante de JCV se une al bolsillo de unión del ácido siálico del virus JCV. Se debería apreciar que se ha documentado que el bolsillo de unión del ácido siálico es el dominio de interacción del receptor del virus. En algunos casos, el bolsillo de unión del ácido siálico incluye los aminoácidos 55-76 y los aminoácidos 265-273 del JCV (Véase, por ejemplo, Gee *et al.*, 2004, JBC 279: 49172-49176). En algunos casos, un anticuerpo neutralizante de JCV se une a una pluralidad de variantes del JCV que tiene uno o más cambios en aminoácidos en el bolsillo de unión del ácido siálico. Sin embargo, en algunos casos, ciertos cambios en aminoácidos en el bolsillo de unión del ácido siálico reducen la unión (e inhibición) por medio de un anticuerpo neutralizante de JCV. En algunos casos, se examina a un sujeto para signos de una infección por JCV. En algunos casos, se examina a un sujeto para infección por una variante del JCV. En algunos casos, se puede monitorizar a un sujeto (por ejemplo, a un sujeto conocido por tener una infección por JCV) para la aparición de una o más variantes del JCV de mayor riesgo. Un resultado positivo para infección por JCV y/o la presencia de ciertas variantes del JCV en una muestra de un paciente se puede utilizar como base para iniciar un tratamiento con un anticuerpo neutralizante de JCV. Sin embargo, se apreciará que, en algunos casos, un anticuerpo neutralizante de JCV se puede administrar a un paciente según un riesgo aumentado para infección o proliferación de JCV y/o un riesgo aumentado para una afección asociada a JCV, independientemente de si se ha realizado un ensayo de detección del JCV en el paciente.

Una reducción en replicación, proliferación, infectividad y/o cualquier otra función del virus JC provocada por un anticuerpo se puede medir (por ejemplo, utilizando un ensayo *in vitro* y/o *in vivo*) comparando una o más funciones del JCV en presencia frente a ausencia de un anticuerpo. En algunos casos, un anticuerpo neutralizante puede dar lugar a una reducción en una o más funciones del virus (por ejemplo, replicación, proliferación, infección, etc.) de aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, o más.

Anticuerpos:

En algunos casos, un anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que se genera contra una VLP del JCV. En algunos casos, el anticuerpo es específico para JCV. En algunos casos, el anticuerpo es específico para la VP1 del JCV.

En algunos casos, un anticuerpo neutralizante que es específico para JCV tiene un efecto neutralizante en la actividad de JCV que es significativamente mayor que su efecto neutralizante en la actividad de uno o más de otros virus, por ejemplo, un virus emparentado (por ejemplo, virus BK). Sin embargo, en algunos casos, un anticuerpo neutralizante se puede unir a uno o más virus con suficiente afinidad para ser útiles para tratar una o más infecciones virales diferentes.

En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunos casos, el anticuerpo es humanizado. En

algunos casos, un anticuerpo tiene la secuencia de R399 o R411 como se describe en el presente documento.

En algunos casos, un anticuerpo comprende una o más de las siguientes secuencias de CDR: CDR1: SEQ ID NO:2, 7, 16-18, 31-33; CDR2: SEQ ID NO:3, 8, 34-37; CDR3: SEQ ID NO:4, 9.

5

En algunos casos, un anticuerpo comprende una o más de las siguientes secuencias de CDR: CDR1: SEQ ID NO:40, 45, 61-63; CDR2: SEQ ID NO:41,46, 64, 65; CDR3: SEQ ID NO:42, 47.

En algunos casos, un anticuerpo comprende una o más de las siguientes secuencias de CDR: CDR1: QASQSIGXN-
10 LA (SEQ ID NO:18, 399-1 N31X), CDR1: GFSFDRNYWIX (SEQ ID NO:33, 399-h C35X), CDR2: LASYLAS (SEQ ID NO:3, 399-1), CDR2: XISAGGSGNTYYATWAKG (SEQ ID NO:37, 399-h C50X), CDR3: QSSYYSPNDNA (SEQ ID NO:4, 399-1), CDR3: FYSGGGYYAGYFTL (SEQ ID NO:9, 399-h), y secuencias de CDR con hasta dos mutaciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO:18, 33, 3, 37, 4 y 9.

15 En algunos casos, un anticuerpo comprende una o más de las siguientes secuencias de CDR: CDR1: QASQSIGGN- LA (SEQ ID NO:17, 399-1 N31G), CDR1: GFSFDRNYWIA (SEQ ID NO:31, 399-h C35A), CDR2: LASYLAS (SEQ ID NO:3, 399-1), CDR2: AISAGGSGNTYYATWAKG (SEQ ID NO:35, 399-h C50A), CDR3: QSSYYSPNDNA (SEQ ID NO:4, 399-1), CDR3: FYSGGGYYAGYFTL (SEQ ID NO:9, 399-h), y secuencias de CDR con hasta dos mutaciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO:17, 31, 3, 35, 4 y 9.

20

En algunos casos, un anticuerpo comprende una o más de las siguientes secuencias de CDR: CDR1: QASQSIGGN- LA (SEQ ID NO:17, 399-1 N31G), CDR1: GFSFDRNYWIA (SEQ ID NO:31, 399-h C35A), CDR2: LASYLAS (SEQ ID NO:3, 399-1), CDR2: AISAGGSGNTYYATWAKG (SEQ ID NO:35, 399-h C50A), CDR3: QSSYYSPNDNA (SEQ ID NO:4, 399-1), y CDR3: FYSGGGYYAGYFTL (SEQ ID NO:9, 399-h).

25

En algunos casos, un anticuerpo comprende una o más de las siguientes CDR: CDR3: QSSYYSPNDNA (SEQ ID NO:4, 399-1), y CDR3: FYSGGGYYAGYFTL (SEQ ID NO:9, 399-h) y secuencias CDR con hasta dos mutaciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 4 y 9.

30 En algunos casos, un anticuerpo comprende las siguientes CDR: CDR1: QASQSIGGNLA (SEQ ID NO:17, 399-1 N31G), CDR2: LASYLAS (SEQ ID NO:3, 399-1), y CDR3: QSSYYSPNDNA (SEQ ID NO:4, 399-1).

En algunos casos, un anticuerpo comprende las siguientes CDR: CDR1: GFSFDRNYWIA (SEQ ID NO:31,399- h C35A), CDR2: AISAGGSGNTYYATWAKG (SEQ ID NO:35, 399-h C50A), y CDR3: FYSGGGYYAGYFTL (SEQ ID
35 NO:9, 399-h).

En algunos casos, un anticuerpo comprende una o más de las siguientes CDR: CDR1: QASQSIGGNLA (SEQ ID NO:17, 399-1 N31G), CDR1: GFSFDRNYWIA (SEQ ID NO:31,399-h C35A), CDR2: LASYLAS (SEQ ID NO:3, 399-1), CDR2: AISAGGSGNTYYATWAKG (SEQ ID NO:35, 399-h C50A), CDR3: QSSYYSPNDNA (SEQ ID NO:4, 399-1), y
40 CDR3: FYSGGGYYAGYFTL (SEQ ID NO:9, 399-h).

En algunos casos, un anticuerpo tiene las siguientes CDR3 de cadena pesada: FYSGGGYYAGYFTL (SEQ ID NO:9, 399-h), y/p las siguientes CDR3 de cadena ligera: QSSYYSPNDNA (SEQ ID NO:4, 399-1).

45 En algunos casos, un anticuerpo tiene las siguientes CDR2 de cadena pesada: AISAGGSGNTYYATWAKG (SEQ ID NO:35, 399-h C50A), y/o las siguientes CDR2 de cadena ligera: LASYLAS (SEQ ID NO:3, 399-1).

En algunos casos, un anticuerpo tiene las siguientes CDR1 de cadena pesada: GFSFDRNYWIA (SEQ ID NO:31, 399h C35A), y/o las siguientes CDR1 de cadena ligera: CDR1: QASQSIGGNLA (SEQ ID NO:17, 399-1 N31G).

50

En algunos casos, se han realizado uno o más cambios de humanización: posición 8 en la CDR1 de la cadena ligera variable, véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 16-18.

En algunos casos, un anticuerpo tiene una región variable de cadena pesada que tiene una de las siguientes SEQ ID
55 NO:6, 19-30. En algunos casos, un anticuerpo tiene una región variable de cadena ligera que tiene una de las siguientes SEQ ID NO:1, 11-15.

En algunos casos, un anticuerpo tiene una región variable de cadena pesada que tiene una de las siguientes SEQ ID
60 NO:43, 51-60. En algunos casos, un anticuerpo tiene una región variable de cadena ligera que tiene una de las siguientes SEQ ID NO: 38, 48-50.

En algunas realizaciones, un anticuerpo tiene una región variable de cadena pesada que tiene SEQ ID NO:20. En

algunas realizaciones, un anticuerpo tiene una región variable de cadena ligera que tiene SEQ ID NO:15.

En algunos casos, uno o más de los siguientes cambios de humanización se han realizado en una región variable de cadena ligera en los siguientes aminoácidos Phe en la posición 2, Asn en la posición 22, Gln en la posición 70 y Val en la posición 75, como se indican en SEQ ID NO: 13-15. En algunos casos, uno o más de los siguientes cambios de humanización se han realizado en una región variable de cadena ligera en los siguientes aminoácidos Phe en la posición 2, Asn en la posición 22, Gln en la posición 70 y Val en la posición 75, como se indican en SEQ ID NO: 13-15.

En algunas realizaciones, un anticuerpo puede ser sustancialmente un anticuerpo de unión a VP-1 de longitud completa o un fragmento funcional de este. Por ejemplo, si un fragmento de un anticuerpo de unión a VP-1 es suficiente para permitir la unión específica por medio de un anticuerpo que se une específicamente a un anticuerpo de unión a VP-1, es un anticuerpo de unión a VP-1 funcional y se puede utilizar en los métodos y kits de la descripción. En algunas realizaciones, un fragmento de anticuerpo se puede utilizar si proporciona suficiente unión para inhibir la función de JCV y/o para ser útil como agente de detección para JCV. Una persona con experiencia ordinaria en la técnica será capaz de identificar los fragmentos de anticuerpos 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, utilizando solo procedimientos habituales y ensayos de unión (por ejemplo, ensayos de competición utilizando un anticuerpo de unión a VP-1 de longitud sustancialmente completa descrito en el presente documento).

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 conejo) y una región Fc de una segunda especie (por ejemplo, un ser humano). Como resultará evidente para una persona con experiencia ordinaria en la técnica, la presente descripción también proporciona fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv y Fd; anticuerpos quiméricos en los que las regiones Fc y/o FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera han sido reemplazadas por secuencias homólogas humanas o no humanas; anticuerpos de fragmentos F(ab')₂ quiméricos en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera han sido reemplazadas por secuencias homólogas humanas y no humanas; anticuerpos de fragmentos Fab quiméricos en las que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera han sido reemplazadas por secuencias homólogas humanas o no humanas; y anticuerpos de fragmentos Fd quiméricos, en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 han sido reemplazadas por secuencias homólogas humanas o no humanas.

En ciertos casos, un anticuerpo neutralizante de JCV puede ser un anticuerpo anti-VP1 de cadena sencilla, un anticuerpo de dominio sencillo o un Nanobody™. Las características de cada uno de estos tipos de anticuerpos y métodos para su uso se conocen en la técnica. Los Nanobodies™ son los fragmentos funcionales más pequeños de anticuerpos y derivan de anticuerpos de cadena sencilla que existen de manera natural (véase Ablynx, Bélgica; ablynx.com). La tecnología Nanobody™ fue desarrollada a partir del descubrimiento de que los camélidos (camellos y llamas) poseen un repertorio único de anticuerpos completamente funcionales que carecen de cadenas ligeras. La estructura de los Nanobody™ consiste en un dominio variable simple (VHH), una región de bisagra y dos dominios constantes (CH2 y CH3). El dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido estable que alberga la capacidad total de unión al antígeno de la cadena pesada original. Los Nanobodies™ combinan las características de los anticuerpos convencionales con características de fármacos de moléculas pequeñas. Los Nanobodies™ muestran una alta especificidad para la diana y una baja toxicidad inherente. Adicionalmente, los Nanobodies™ son muy estables, se pueden administrar por medios distintos a la inyección y son fáciles de fabricar. En ciertos casos, un anticuerpo neutralizante JCV terapéutico, un resto de inmovilización y/o un resto de detección pueden ser un Nanobody™ humanizado.

En algunos casos, un anticuerpo neutralizante de JCV ejemplar 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 particular descrito en el presente documento, o CDR que son, en suma, al menos un 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 o un 99 % idénticas a un anticuerpo de este tipo, por ejemplo, CDR1: SEQ ID NO:2, 7, 16-18, 31-33; CDR2: SEQ ID NO:3, 8, 34-37; CDR3: SEQ ID NO:4, 9, y CDR1: SEQ ID NO:40, 45, 61-63; CDR2: SEQ ID NO:41, 46, 64, 65; CDR3: SEQ ID NO:42, 47. En algunos casos, un anticuerpo neutralizante de JCV ejemplar 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 particular descrito en el presente documento.

En algunos casos, un anticuerpo neutralizante de JCV ejemplar 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 particular descrito en el presente documento, o CDR que incluyen una, hasta dos, hasta tres, hasta cuatro, hasta cinco, hasta seis, hasta siete, hasta ocho, hasta nueve o hasta diez cambios en aminoácidos en comparación con, por ejemplo, CDR1: SEQ ID NO:2, 7, 16-18, 31-33; CDR2: SEQ ID NO:3, 8, 34-37; CDR3: SEQ ID NO:4, 9, y CDR1: SEQ ID NO:40, 45, 61-63; CDR2: SEQ ID NO:41, 46, 64, 65; CDR3: SEQ ID NO:42, 47. En un caso, los bucles hipervariables H1 y H2 tienen la misma estructura canónica que los de un anticuerpo descrito en el presente documento. En un caso, los bucles hipervariables

L1 y L2 tienen la misma estructura canónica que los de un anticuerpo descrito en el presente documento.

En un caso, la secuencia de aminoácidos de la secuencia de dominio variable HC y/o LC es al menos un 70, 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99 o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio variable HC y/o LC de un anticuerpo descrito en el presente documento, por ejemplo, SEQ ID NO 1, 6, 11-15, 19-30 y 43, 51-60, 38, 48-50. La secuencia de aminoácidos de la secuencia de dominio variable HC y/o LC puede diferir en al menos un aminoácido, pero no más de diez, ocho, seis, cinco, cuatro, tres o dos aminoácidos de la secuencia correspondiente de un anticuerpo descrito en el presente documento, por ejemplo, SEQ ID NO 1, 6, 11-15, 19-30 y 43, 51-60, 38, 48-50. Por ejemplo, las diferencias pueden estar principal o totalmente en las regiones de marco.

Las secuencias de aminoácidos de las secuencias de dominio variable HC y LC se pueden codificar por una secuencia que se hibrida en condiciones de alta astringencia a una secuencia de ácidos nucleicos descrita en el presente documento o una que codifica un dominio variable o a un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento. En una realización, las secuencias de aminoácidos de una o más regiones de marco (por ejemplo, FR1, FR2, FR3 y/o FR4) del dominio variable HC y/o LC son al menos un 70, 80, 85, 90, 92, 95, 97, 98, 99 o un 100 % idénticas a las regiones de marco correspondientes de los dominios variables HC y LC de un anticuerpo descrito en el presente documento. En una realización, una o más regiones de marco de cadena pesada o ligera (por ejemplo, FR1, FR2 y FR3 de HC) son al menos un 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o un 100 % idénticas a la secuencia de regiones de marco correspondientes de un anticuerpo de la línea germinal humana.

Los cálculos de "homología" o "identidad de secuencia" entre dos secuencias (las expresiones se utilizan indistintamente en el presente documento) se pueden realizar como se indica a continuación. Las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para la alineación óptima y las secuencias no homólogas pueden ignorarse para fines comparativos). La alineación óptima se determina como la mejor puntuación utilizando el programa GAP en el paquete de *software* GCG con una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización por hueco de 12, una penalización de extensión de hueco de 4 y una penalización de hueco de desplazamiento de marco de 5. Luego se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (tal como se utiliza en el presente documento, "identidad" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a "homología" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias.

El experto en la materia se dará cuenta de que se pueden hacer sustituciones de aminoácidos conservadoras anticuerpos de neutralizantes de JCV para proporcionar variantes funcionalmente equivalentes de estos anticuerpos, por ejemplo, las variantes conservan las capacidades funcionales de inhibición de una o más funciones del JCV. Como se usa en el presente documento, una "sustitución de aminoácidos conservadora" se refiere a una sustitución de aminoácidos que no altera las características de carga o de tamaño relativas de la proteína en la que se realiza la sustitución de aminoácidos. Las variantes pueden prepararse según métodos para alterar la secuencia de polipéptidos conocidos por una persona con experiencia ordinaria en la técnica tal como se encuentran en referencias que recopilan métodos de este tipo, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, *et al.*, eds., Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, o *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1989. Las variantes funcionalmente equivalentes ejemplares de anticuerpos neutralizantes de JCV incluyen sustituciones de aminoácidos conservadoras en las secuencias de aminoácidos de proteínas descritas en el presente documento. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen sustituciones hechas entre aminoácidos dentro de los siguientes grupos: (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.

Como se usa en el presente documento, la expresión "se hibrida bajo condiciones de alta astringencia" describe condiciones para hibridación y lavado. Se pueden encontrar directrices para la realización de las reacciones de hibridación en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3. 6. Se describen métodos acuosos y no acuosos en esa referencia y se puede utilizar cualquiera de ellos. Las condiciones de hibridación de alta astringencia pueden incluir hibridación en 6 x SSC a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2 x SSC, SDS al 0,1 % a 65 °C o condiciones sustancialmente similares.

Los anticuerpos se pueden someter a prueba para una propiedad funcional, por ejemplo, neutralización del JCV, por ejemplo, como se describe en el presente documento o utilizando otras técnicas para evaluar replicación, propagación, infectividad y/o otras funciones del JCV.

En algunos casos, se puede utilizar una combinación de dos o más anticuerpos diferentes. En algunos casos, se pueden utilizar uno o más anticuerpos en combinación con uno o más de otros agentes. En algunos casos, se pueden

utilizar anticuerpos tetravalentes, anticuerpos acoplados a transportadores de la barrera hematoencefálica, anticuerpos acoplados a reactivos de colorante de contraste y/o anticuerpos radiomarcados (por ejemplo, como marcadores de presencia de JCV en pacientes).

5 Obtención de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno:

Los anticuerpos neutralizantes de JCV se pueden generar por medio de inmunización, por ejemplo, utilizando un animal como un conejo. Una VLP de JCV, o una proteína de VLP (por ejemplo, VP1) se puede utilizar como inmunógeno. En algunos casos, se puede utilizar una VLP o proteína de VLP que tiene una secuencia de tipo salvaje
 10 o normal. En algunos casos, una VLP o proteína de VLP que tiene una o más mutaciones (por ejemplo, en el bolsillo de unión del ácido siálico de VP1) se puede utilizar como inmunógeno.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se pueden utilizar indistintamente en el presente documento. Un anticuerpo o una inmunoglobulina comprende al menos el dominio variable de una cadena pesada y, normalmente, comprende al menos los dominios variables de una cadena pesada y de una cadena ligera. Las estructuras básicas de la inmunoglobulina en sistemas vertebrados se comprenden relativamente bien. Véase, por ejemplo, Harlow *et al.* Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988). Los anticuerpos y las inmunoglobulinas incluyen un gran número de clases de polipéptidos que se pueden distinguir bioquímicamente. Los expertos en la técnica apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o epsilon, con algunas subclases entre ellas (por ejemplo, gamma1-gamma4). Es la naturaleza de esta cadena la que determina la "clase" de un anticuerpo como IgG, IgM, IgA IgG, o IgE, respectivamente. Las subclases (isotipos) de inmunoglobulina, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc. están bien caracterizadas y se sabe que confieren especialización funcional. Versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente discernibles por un experto en la técnica en vista de la descripción instantánea y anticuerpos neutralizantes de JCV de diferentes clases se pueden
 15 obtener o diseñar como se describe en el presente documento. Se debe apreciar que todas las clases de inmunoglobulina se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Sin embargo, en términos generales, la siguiente discusión se dirigirá a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a IgG, una molécula estándar de inmunoglobulina comprende dos polipéptidos de cadena ligera idénticos de peso molecular aproximadamente 23.000 daltons, y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos de peso molecular 53.000-70.000.
 20 Típicamente, las cuatro cadenas se unen por medio de enlaces disulfuro en una configuración en "Y" donde las cadenas ligeras se unen a las cadenas pesadas empezando en la boca de la "Y" y continuando a través de la región variable.

Las cadenas ligeras se clasifican tanto como kappa como lambda. Cada clase de cadena pesada se puede unir a una
 35 cadena ligera tanto kappa como lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas se unen de manera covalente entre sí, y las porciones de "cola" de las dos cadenas pesadas se unen entre sí por medio de enlaces disulfuro covalentes o de enlaces no covalentes mientras que las inmunoglobulinas se generan por hibridomas, células B o por células huésped diseñadas genéticamente. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos van desde el N-terminal en los extremos bifurcados de la configuración en Y hasta el C-terminal en el final de cada cadena.

Tanto las cadenas ligeras como las pesadas se dividen en dos regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se utilizan de manera funcional. A este respecto, se apreciará que los dominios variables de las porciones de cadena ligera (VL) y pesada (VH) determinan el reconocimiento y especificidad del antígeno. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3)
 45 confieren propiedades biológicas importantes tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión al receptor Fc, unión a complemento, y similares. Por convención, la numeración de los dominios de región constante aumenta a medida que se vuelven más distales del sitio de unión a antígeno o del amino terminal del anticuerpo. La porción N-terminal es una región variable y la porción C-terminal es una región constante; los dominios CH3 y CL comprenden en realidad el carboxi terminal de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

Como se describe en el presente documento, la región variable permite al anticuerpo reconocer de manera selectiva y unirse específicamente a epítomos en antígenos. Esto es, el dominio VL y el dominio VH, o subconjunto de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión a antígeno tridimensional. Esta estructura cuaternaria del anticuerpo forma el sitio de unión a
 55 antígeno presente en el extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión a antígeno se define por medio de tres CDR en cada una de las cadenas VH y VL. En algunos casos, por ejemplo, ciertas moléculas de inmunoglobulina derivadas de especies de camélidos o diseñadas basándose en inmunoglobulinas de camélidos, una molécula completa de inmunoglobulina puede consistir solo en cadenas pesadas, sin cadenas ligeras. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, Nature 363:446-448 (1993)

En anticuerpos que existen de manera natural, las seis "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR" presentes en cada dominio de unión a antígeno son secuencias cortas no contiguas de aminoácidos que se colocan

específicamente para formar el dominio de unión a antígeno mientras el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un entorno acuoso. El resto de los aminoácidos en los dominios de unión a antígeno, denominados como regiones de "marco", muestran menos variabilidad intramolecular. En gran medida, las regiones de marco adoptan una conformación de lámina beta y las CDR forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Por consiguiente, las regiones de marco actúan para formar un andamiaje que proporciona la colocación de las CDR en la orientación correcta por medio de interacciones intercatenarias no covalentes. El dominio de unión a antígeno formado por las CDR colocadas define una superficie complementaria al epítipo en el antígeno inmunoreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo a su epítipo cognado. Los aminoácidos que comprenden las CDR y las regiones de marco, respectivamente, se pueden identificar fácilmente para cualquier región variable de cadena pesada o ligera dada por una persona con experiencia ordinaria en la técnica, ya que se han definido de manera precisa (véase "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., *et al.*, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, (1983); y Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987).

- 15 Se debería apreciar que los anticuerpos obtenidos como se describe en el presente documento se pueden alterar para eliminar o reemplazar una o más CDR. En algunos casos, se pueden generar fragmentos de unión a antígeno que conservan la especificidad del antígeno pero que carecen de una o más de las seis CDR de un anticuerpo de longitud completa. De manera alternativa, se pueden conservar una o más CDR de un anticuerpo (por ejemplo, CDR3) y una o más de las otras CDR se pueden diseñar y/o reemplazar con una CDR diferente, por ejemplo, para alterar la especificidad y/o afinidad de unión al antígeno.

En el caso en el que hay dos o más definiciones de un término que se utiliza y/o acepta en la técnica, la definición del término como se utiliza en el presente documento pretende incluir todos los significados de este tipo a menos que se indique explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es el uso de la expresión "región determinante de la complementariedad" ("CDR") para describir los sitios de combinación con antígeno no contiguos encontrados en la región variable de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Esta región particular se ha descrito por Kabat *et al.*, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) y por Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), donde las definiciones incluyen solapamiento o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Sin embargo, la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes de estos se pretende que se encuentre dentro del alcance del término tal como se define y utiliza en el presente documento. Los números exactos de residuos que abarcan una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y del tamaño de la CDR. Los expertos en la técnica pueden determinar habitualmente qué residuos comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

Kabat *et al.* también definen un sistema de numeración para secuencias de dominios variables que es aplicable a cualquier anticuerpo. Una persona con experiencia ordinaria en la técnica puede asignar inequívocamente este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia de dominio variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la secuencia en sí misma. Tal como se utiliza en el presente documento, la "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración descrito por Kabat *et al.*, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). A menos que se especifique lo contrario, las referencias a la numeración de posiciones de residuos de aminoácidos específicos en un anticuerpo neutralizante o variante de fragmento de unión antígeno, o derivado de estos de la presente descripción, incluida la presente invención, son según el sistema de numeración de Kabat.

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

Tal como se describe en el presente documento, los anticuerpos de unión a JCV o fragmentos de unión a antígeno, variantes, o derivados de estos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, mutiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados, o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos de unión a epítipo, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs, anticuerpos de cadena sencilla Fvs (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fvs unidos por disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden tanto un dominio VL como VH, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (que incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para los anticuerpos neutralizantes descritos en el presente documento). Las moléculas ScFv se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense N.º 5.892.019. Las moléculas de inmunoglobulina o de anticuerpo neutralizante de JCV pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA y IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

Los fragmentos de anticuerpos neutralizantes de JCV, incluidos los anticuerpos de cadena sencilla, pueden comprender la(s) región (regiones) variable(s) sola(s) o en combinación con la totalidad o una parte de lo siguiente: región de bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. También, los fragmentos de unión a antígeno neutralizantes de JCV
5 pueden comprender cualquier combinación de región (regiones) variable(s) con una región de bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "porción de cadena pesada" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena pesada de inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una porción de
10 cadena pesada comprende al menos uno de lo siguiente: un dominio CH1, un dominio de bisagra (por ejemplo, región de bisagra superior, intermedia y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3, o una variante o fragmento de estos. Por ejemplo, un polipéptido de unión para su uso en la invención puede comprender una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio de bisagra y un dominio CH2; una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1 y un dominio CH3;
15 una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio de bisagra y un dominio CH3, o una cadena polipeptídica que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio de bisagra, un dominio CH2, y un dominio CH3. En otra realización, un polipéptido de la invención comprende una cadena polipeptídica 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, todo o parte de un dominio CH2). Tal como se
20 describe anteriormente, una persona con experiencia ordinaria en la técnica entenderá que estos dominios (por ejemplo, porciones de cadena pesada) se pueden modificar de tal manera que varíen en la secuencia de aminoácidos a partir de la molécula de inmunoglobulina que existe de manera natural.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "porción de cadena ligera" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena ligera de inmunoglobulina. Preferiblemente, la porción de cadena ligera
25 comprende al menos uno de un dominio VL o CL.

Los anticuerpos neutralizantes, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de estos descritos en el presente documento se pueden describir o especificar en términos del (de los) epítipo(s) o porción (porciones) de un
30 antígeno, por ejemplo, un polipéptido diana de la proteína VP1 del JCV que estos reconocen o a los que se unen específicamente. La porción del polipéptido diana que interactúa 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, pero típicamente comprende al menos dos epítopos, y puede incluir cualquier número de epítopos, dependiendo del tamaño, conformación y tipo de antígeno. Además, se debería tener en cuenta que un "epítipo" en
35 un polipéptido diana puede ser o incluir elementos no polipeptídicos, por ejemplo, un "epítipo" puede incluir una cadena lateral de carbohidratos.

El tamaño mínimo de epítipo de péptido o polipéptido para un anticuerpo se cree que es aproximadamente de cuatro a cinco aminoácidos. Los epítopos de péptido o polipéptido preferiblemente contienen al menos siete, más
40 preferiblemente al menos nueve y de manera más preferida entre al menos aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos. Ya que una CDR puede reconocer un péptido o polipéptido antigénico en su forma terciaria, los aminoácidos que comprenden un epítipo no necesitan ser contiguos y, en algunos casos, incluso no necesitan estar en la misma cadena peptídica. En algunos casos, un epítipo de péptido o de polipéptido reconocido por anticuerpos descritos en el presente documento contienen una secuencia de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, más
45 preferiblemente al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, o entre de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 aminoácidos contiguos o no contiguos de una proteína de VLP del JCV (por ejemplo, VP1). (Véase, por ejemplo, la publicación internacional WO2010/090757).

En términos generales, "se une específicamente" significa que un anticuerpo se une a un epítipo por medio de su
50 dominio de unión a antígeno, y que la unión conlleva alguna complementariedad entre el dominio de unión a antígeno y el epítipo. Según esta definición, se dice que un anticuerpo "se une específicamente" a un epítipo cuando este se une a un epítipo, por medio de su dominio de unión a antígeno más fácilmente de lo que se uniría a un epítipo aleatorio no emparentado. El término especificidad se utiliza en el presente documento para cuantificar la afinidad relativa por la que un determinado anticuerpo se une a un determinado epítipo.
55

Se dice que un anticuerpo inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo de referencia a un epítipo dado si este se une preferencialmente a ese epítipo hasta el punto de que bloquea, en cierto grado, la unión del anticuerpo de referencia al epítipo. La inhibición competitiva se puede determinar por medio de cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, en ensayos de competición de ELISA. Se puede decir que un anticuerpo inhibe de manera
60 competitiva la unión del anticuerpo de referencia a un epítipo dado en al menos un 90 %, al menos un 80 %, al menos un 70 %, al menos un 60 %, o al menos un 50 %.

Tal como se utiliza en el presente documento, 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 *et al.* Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988) páginas 27-28. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "avidez" se refiere a la estabilidad general del complejo entre una población de

5 inmunoglobulinas y un antígeno, que es, la fuerza de combinación funcional de una mezcla de inmunoglobulina con el antígeno. Véase, por ejemplo, Harlow, páginas 29-34. La avidez está relacionada con la afinidad de moléculas de inmunoglobulina individuales en la población con epítipos específicos, y también con la valencia de las inmunoglobulinas y del antígeno. Por ejemplo, la interacción entre un anticuerpo monoclonal bivalente y un antígeno con una estructura de epítipo sumamente repetitiva, como un polímero, sería de avidez alta.

10 Los anticuerpos neutralizantes o fragmentos de unión a antígeno, variantes y derivados de estos descritos en el presente documento se pueden describir también o especificar en términos de su reactividad cruzada. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "reactividad cruzada" se refiere a la capacidad de un anticuerpo, específico para un antígeno, de reaccionar con un segundo antígeno; una medida de parentesco entre dos sustancias

15 antigénicas diferentes. Por consiguiente, un anticuerpo es de reactividad cruzada si se une a un epítipo distinto del que indujo su formación. En términos generales, un epítipo de reactividad cruzada contiene muchas de las mismas características estructurales complementarias del epítipo inductor y, en algunos casos, en realidad, puede encajar mejor que el original.

20 Por ejemplo, ciertos anticuerpos tienen algún grado de reactividad cruzada, en el sentido de que se unen a epítipos emparentados, pero no son idénticos, por ejemplo, los epítipos con al menos un 95 %, al menos un 90 %, al menos un 85 %, al menos un 80 %, al menos un 75 %, al menos un 70 %, al menos un 65 %, al menos un 60 %, al menos un 55 %, y al menos un 50 % de identidad (como se calcula utilizando métodos conocidos en la técnica y se describe en el presente documento) a un epítipo de referencia. Se puede decir que un anticuerpo tiene poca reactividad cruzada o

25 que no tiene si no se une a epítipos con menos de un 95 %, al menos un 90 %, al menos un 85 %, al menos un 80 %, al menos un 75 %, al menos un 70 %, al menos un 65 %, al menos un 60 %, al menos un 55 %, y al menos un 50 % de identidad (como se calcula utilizando métodos conocidos en la técnica y se describe en el presente documento) a un epítipo de referencia. Se puede considerar que un anticuerpo es "sumamente específico" para un cierto epítipo, si no se une a cualquier otro análogo, ortólogo u homólogo de ese epítipo.

30 Los anticuerpos neutralizantes o fragmentos de unión a antígeno, variantes y derivados de estos descritos en el presente documento se pueden describir también o especificar en términos de su afinidad de unión a un polipéptido. Por ejemplo, un anticuerpo neutralizante de JCV se puede unir a un péptido de 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,

35 10^{-12} M, 10^{-13} M, 10^{-14} M, o 10^{-15} M.

Los anticuerpos neutralizantes o fragmentos de unión a antígeno, variantes y derivados de estos descritos en el presente documento pueden ser "multiespecíficos", por ejemplo, biespecíficos, triespecíficos o de multiespecificidad mayor, lo que significa que reconoce y se une a dos o más epítipos diferentes presentes en uno o más antígenos

40 diferentes (por ejemplo, proteínas) a la misma vez. Por consiguiente, si un anticuerpo neutralizante es "monoespecífico" o "multiespecífico" por ejemplo, "biespecífico", se refiere al número de epítipos diferentes con los que reacciona un polipéptido de unión. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítipos de un polipéptido diana descrito en el presente documento o puede ser específico para un polipéptido diana al igual que para un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido.

45 Humanización:

En algunas realizaciones, un anticuerpo de animal (por ejemplo, anticuerpo de conejo) se puede modificar, por ejemplo, intercambiando la región Fc con una región Fc de una especie diferente (por ejemplo, con una región Fc

50 humana). En algunas realizaciones, uno o más cambios de humanización se pueden hacer también (por ejemplo, en una o más de las regiones de marco del anticuerpo).

En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden diseñar, por medio de reemplazamiento parcial de la región de marco y cambio de secuencia. En algunas realizaciones, las CDR derivan de

55 un anticuerpo de una clase diferente y/o una especie diferente a la de las regiones de marco. En algunas realizaciones, un anticuerpo diseñado contiene una o más CDR "donantes" de un anticuerpo no humano de especificidad conocida que se injerta en una región de marco de cadena pesada o ligera humana. Puede ser no necesario reemplazar todas las CDR con las CDR completas de la región variable donante para transferir la capacidad de unión a antígeno de un dominio variable a otro. Más bien, puede ser solo necesario transferir aquellos residuos que son necesarios para

60 mantener la actividad del sitio de unión de la diana. Dadas las explicaciones descritas en, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 6.180.370, estará bien dentro de la competencia de los expertos en la técnica, tanto llevar a cabo una experimentación habitual como por medio de prueba de ensayo y error

para obtener un anticuerpo funcional diseñado o humanizado.

El documento EP 239 400 (Winter *et al.*) describe la alteración de anticuerpos mediante sustitución (dentro de una región variable dada) de sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) para una especie con los de otra.

5 Se predice que será menos probable que anticuerpos sustituidos con CDR provoquen una respuesta inmune en los seres humanos en comparación con anticuerpos quiméricos verdaderos porque los anticuerpos sustituidos con CDR contienen considerablemente menos componentes no humanos. (Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332, 323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, Science 239, 1534-1536). Típicamente, las CDR de un anticuerpo murino son sustituidas en las regiones correspondientes en un anticuerpo humano utilizando tecnología de ácido nucleico

10 recombinante para producir secuencias que codifican el anticuerpo sustituido deseado. Se pueden añadir segmentos de genes de la región constante humana del isotipo deseado (habitualmente gamma I para CH y kappa para CL) y los genes de la cadena pesada y ligera humanizados son co-expresados en células de mamífero para producir un anticuerpo humanizado soluble.

15 Queen *et al.*, 1989 Proc Natl Acad Sci EE. UU. Dic;86(24): 10029-33 y la publicación internacional WO 90/07861 han descrito un procedimiento que incluye la elección de regiones de marco V humanas mediante análisis por ordenador en cuanto a la óptima homología de secuencia de la proteína con la región de marco V del anticuerpo murino original, y el modelado de la estructura terciaria de la región V murina para visualizar los residuos de aminoácido marco que es probable que interactúen con las CDR murinas. Estos residuos de aminoácidos murinos se superponen entonces

20 sobre el marco humano homólogo. Véanse también las Patentes de Estados Unidos N.º 5.693.762; 5.693.761; 5.585.089; y 5.530.101. Tempest *et al.*, 1991, Biotechnology 9, 266-271) utilizan, como patrón, los marcos de la región V derivados de las cadenas pesadas y ligeras NEWM y REI, respectivamente, para el injerto de CDR sin la introducción en los radicales de residuos de ratón. Una ventaja de utilizar el enfoque de Tempest *et al.*, para construir anticuerpos humanizados basados en NEWM y REI es que las estructuras tridimensionales de las regiones

25 variables de NEWM y REI son conocidas de la cristalografía de rayos X y, de este modo, se pueden modelar las interacciones específicas entre las CDR y residuos de marco de la región V. Sin embargo, se debería apreciar que los planteamientos similares se pueden basar en una o más estructuras de anticuerpo diferentes a las conocidas (por ejemplo, basadas en una o más estructuras de Fab). En algunas realizaciones, se puede utilizar un marco de línea germinal humana (por ejemplo, como se describe para el anticuerpo 399 en el presente documento).

30 En algunas realizaciones, una región VH de conejo (por ejemplo, el anticuerpo 399 en el presente documento) tiene un marco 1 y/o un marco 3 que es más corto que las regiones de marco humanas correspondientes. En algunas realizaciones, se pueden hacer delecciones de aminoácidos correspondientes en variantes humanizadas de anticuerpos de conejo. En algunas realizaciones, estas delecciones no crean un gran efecto en la afinidad. Por ejemplo,

35 se encuentran afinidades de unión similares para H4 (tipo humano, sin delecciones) y H9 (más tipo conejo, con delecciones).

En algunas realizaciones, un anticuerpo de conejo se puede modificar (por ejemplo, como parte del procedimiento de humanización) al eliminar uno o más enlaces disulfuro. Por lo tanto, uno o más residuos Cys en los dominios VL y CL

40 se pueden reemplazar con residuos humanos en algunas realizaciones sin pérdida de función. Un ejemplo no limitativo de esto se describe en el presente documento (por ejemplo, véanse los Ejemplos). Hay también un enlace disulfuro entre CDR H1 y CDR H2 (residuos 35a y 50) que se conserva en muchos dominios VH de conejo (aproximadamente una tercera parte de secuencias VH). En algunas realizaciones, uno o ambos residuos de Cys de este par se pueden reemplazar con otros residuos sin pérdida de afinidad.

45 Los anticuerpos no humanos pueden ser modificados para incluir sustituciones que insertan secuencias humanas de inmunoglobulina, por ejemplo, residuos de aminoácidos consenso humanos en posiciones particulares, por ejemplo, en una o más de las siguientes posiciones (preferiblemente al menos cinco, diez, doce, o todas): (en el 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,

50 73L, 85L, 87L, 98L, y/o (en el 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 (según la numeración de Kabat). Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 6.407.213.

Producción de Anticuerpos:

55 Se pueden producir anticuerpos neutralizantes de JCV monoclonales (por ejemplo, monoclonales de conejo, ratón, quiméricos, humanizados, completamente humanos, etc.) utilizando técnicas conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, los anticuerpos completamente humanos se pueden producir, por ejemplo, utilizando esplenocitos humanos cebados *in vitro*, según se describe por Boerner *et al.*, 1991, J. Immunol., 147, 86-95. Se pueden preparar

60 por clonación del repertorio según se describe por Persson *et al.*, 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. EE. UU., 88: 2432-2436 o por Huang y Stollar, 1991, J. Immunol. Methods 141, 227-236. Documento US 5.798.230. También se pueden utilizar grandes bancos de presentación de fagos humanos no inmunizados para aislar anticuerpos de alta afinidad que se

pueden desarrollar como agentes terapéuticos humanos utilizando una tecnología de fagos estándar (véase, por ejemplo, Vaughan *et al.*, 1996 Nat Biotechnol. Mar;14(3):309-14; Hoogenboom *et al.* (1998) Immunotechnology 4:1-20; y Hoogenboom *et al.* (2000) Immunol Today 2:371-8; Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N.º 2003-0232333). Los anticuerpos pueden producirse en células procariotas y eucariotas. En algunas realizaciones, los anticuerpos (por ejemplo, scFvs) se expresan en una célula de levadura tal como *Pichia* (véase, por ejemplo, Powers *et al.* (2001) J Immunol Methods. 251:123-35), *Hansenula*, o *Saccharomyces*.

En algunas realizaciones, los anticuerpos, en particular anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, IgG, se producen en células de mamífero. Las células huésped de mamífero ejemplares para expresión recombinante incluyen células ovario de hámster chino (células CHO) (incluidas células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 77:4216-4220, utilizadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, según se describe en Kaufman y Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), líneas celulares linfocíticas, 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, se puede utilizar una célula epitelial de mamífero.

Además de la(s) secuencia(s) de ácidos nucleicos que codifica(n) el dominio de inmunoglobulina, los vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias adicionales tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N.º 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Los genes marcadores seleccionables ejemplares incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped dhfr-con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para la selección de G418).

En un sistema ejemplar para la expresión recombinante de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de longitud completa o una porción de unión a antígeno de este), un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo se introduce en células CHO dhfr-mediante transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de la cadena pesada y ligera del anticuerpo se une cada uno operativamente a elementos reguladores de potenciador/promotor (por ejemplo, derivados de SV40, CMV, adenovirus y similares tales como un elemento regulador de potenciador de CMV/promotor de AdMLP o un elemento regulador de potenciador de SV40/promotor de AdMLP) para impulsar altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector utilizando la selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del medio de cultivo. Se utilizan técnicas de biología molecular estándar para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar los transformantes, cultivar las células huésped y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Por ejemplo, algunos anticuerpos se pueden aislar por medio de cromatografía de afinidad con una Proteína A o Proteína G. En algunas realizaciones, se pueden clonar y expresar regiones variables de anticuerpo de conejo en células CHO.

Los anticuerpos también pueden incluir modificaciones, por ejemplo, modificaciones que alteran la función de Fc, por ejemplo, para disminuir o eliminar la interacción con un receptor de Fc o con Clq, o ambos. Por ejemplo, la región constante de IgG1 humana se puede mutar en uno o más residuos, por ejemplo, uno o más de los residuos 234 y 237, por ejemplo, según la numeración en la Patente de Estados Unidos N.º 5.648.260. Otras modificaciones ejemplares incluyen aquellas descritas en la Patente de Estados Unidos N.º 5.648.260.

Para algunos anticuerpos que incluyen un dominio Fc, el sistema de producción de anticuerpos se puede diseñar para sintetizar anticuerpos en los que la región Fc se glicosila. Por ejemplo, el dominio Fc de moléculas de IgG se glicosila en la asparagina 297 en el dominio CH2. Esta asparagina es el sitio para la modificación con oligosacáridos de tipo biantenarico. Esta glicosilación participa en funciones efectoras mediadas por receptores Fcγ y complemento Clq (Burton y Woof (1992) Adv. Immunol. 51:1-84; Jefferis *et al.* (1998) Immunol. Rev. 163:59-76). El dominio Fc se puede producir en un sistema de expresión de mamífero que glicosila adecuadamente el residuo correspondiente a la asparagina 297. El dominio Fc también puede incluir otras modificaciones postraduccionales eucariotas.

Los anticuerpos también se pueden producir por un animal transgénico. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 5.849.992 describe un método para expresar un anticuerpo en la glándula mamaria de un mamífero transgénico. Se construye un transgén que incluye un promotor específico para la leche y ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo de interés y una secuencia señal para la secreción. La leche producida por las hembras de los mamíferos transgénicos de este tipo incluye, secretado en su interior, el anticuerpo de interés. El anticuerpo se puede purificar a partir de la leche, o para algunas aplicaciones, se puede utilizar directamente.

En ciertos casos, en lugar de humanizar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno existente de una especie diferente, un animal que contiene células productoras de inmunoglobulina que tienen loci de inmunoglobulina natural,

humana o parcialmente humana se pueden inmunizar. En algunos casos, el animal no humano incluye al menos una parte de un gen de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, es posible diseñar cepas de animales deficientes en la producción de anticuerpos de animal utilizando grandes fragmentos de los loci de Ig humana. Utilizando la tecnología de hibridoma, se pueden producir y seleccionar anticuerpos monoclonales específicos para antígenos derivados de los genes con la especificidad deseada.

Aplicaciones terapéuticas:

- En algunos casos, un anticuerpo neutralizante descrito en el presente documento se puede administrar a un sujeto que está en terapia con un fármaco inmunosupresor. En algunos casos, un anticuerpo neutralizante de JCV se puede utilizar para evitar el desarrollo o evolución de LMP en un sujeto que está en tratamiento para esclerosis múltiple (EM). Por ejemplo, un sujeto que está en tratamiento con natalizumab o un anticuerpo de unión VLA-4 emparentado puede ser un candidato para tratamiento con un anticuerpo neutralizante de JCV.
- 15 Natalizumab y anticuerpos de unión a VLA-4 emparentados se describen, por ejemplo, en el documento US 5.840.299. mAb 21.6 y HP 1/2 son anticuerpos monoclonales murinos ejemplares que se unen a VLA-4. Natalizumab es una versión humanizada de mAb murino 21.6 (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 5.840.299). También se ha descrito una versión humanizada de HP1/2 (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 6.602.503). Se describen varios anticuerpos de unión a VLA-4 monoclonales adicionales tales como HP2/1, HP2/4, L25 y P4C2 (por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 6.602.503; Sanchez-Madrid *et al.*, 1986 Eur. J. Immunol., 16:1343-1349; Hemler *et al.*, 1987 J. Biol. Chem. 2:11478-11485; Issekutz y Wykretowicz, 1991, J. Immunol., 147: 109 (TA-2 mab); Pulido *et al.*, 1991 J. Biol. Chem., 266(16): 10241-10245; y la Patente de Estados Unidos N.º 5.888.507). Muchos anticuerpos de unión a VLA-4 útiles interactúan con VLA-4 en células, por ejemplo, linfocitos, pero no provocan una agregación celular. Sin embargo, se ha observado que otros anticuerpos de unión anti-VLA-4 provocan dicha agregación. HP1/2 no provoca agregación celular. El MAb HP1/2 (Sanchez-Madrid *et al.*, 1986 Eur. J. Immunol., 16:1343-1349) tiene una potencia extremadamente alta, bloquea la interacción de VLA-4 tanto con VCAM1 como con fibronectina y tiene especificidad para el epítipo B en VLA-4. Este anticuerpo y otros anticuerpos específicos para el epítipo B (tales como los anticuerpos de unión al epítipo B1 o B2; Pulido *et al.*, 1991 J. Biol. Chem., 266(16): 10241-10245) representan una clase de anticuerpos de unión a VLA-4 útiles.

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

Aplicaciones:

En algunos casos, un anticuerpo neutralizante se puede administrar a un sujeto para prevenir o tratar una infección por el virus JC, y/o para prevenir o tratar LMP.

- En algunos casos, 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 lo siguiente proliferación (por ejemplo, replicación viral), tasa de mutación e infectividad. En algunos casos, se pueden utilizar composiciones de este tipo para tratar o suprimir afecciones asociadas con la actividad del virus JC en sujetos que se han infectado con un virus JC, o para reducir el riesgo de infección con el virus JC. Se pueden utilizar composiciones de este tipo para prevenir infección viral por JCV, para evitar un aumento en actividad viral del JCV (por ejemplo, infección por JCV activa del cerebro), para evitar proliferación del virus JC, para evitar síntomas asociados con infección viral, para tratar a un sujeto infectado con un virus JCV, 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 afección asociada con infección por un virus JC (por ejemplo, LMP). Las composiciones de la descripción se pueden administrar también a un sujeto en riesgo de una infección viral o en riesgo de un aumento en actividad viral (por ejemplo, proliferación viral, por ejemplo, en el cerebro o SNC), independientemente de si se sabe realmente que el sujeto ha estado expuesto a, o se ha infectado por, el virus.

- En algunas instancias, una o más composiciones de anticuerpos se pueden administrar a sujetos que tienen un sistema inmune deficiente. Se apreciará que un sistema inmune de un sujeto puede ser deficiente debido a tratamiento con un agente terapéutico inmunosupresor y/o debido a una enfermedad o afección que tiene un impacto en el sistema inmune. En algunos casos, una o más composiciones de anticuerpos se pueden administrar a un sujeto que está en riesgo de LMP debido a un sistema inmune deficiente, independientemente de si se sabe que el sujeto está infectado con JCV o se sabe que se ha estado expuesto al JCV. Por consiguiente, las composiciones de la descripción se pueden administrar a sujetos que están en tratamiento inmunosupresor para una enfermedad o afección. En algunos casos, las composiciones de la descripción se pueden administrar a pacientes con esclerosis múltiple (EM) que están en tratamiento con uno o más agentes inmunosupresores (por ejemplo, natalizumab). Sin embargo, en algunos casos, las composiciones de la descripción se pueden administrar a sujetos que tienen un sistema inmune debilitado

provocado por la propia enfermedad o afección, en lugar de por un tratamiento inmunosupresor. Por ejemplo, los sujetos con un patógeno inmunodepresor (por ejemplo, un virus como el VIH) se pueden tratar con una o más composiciones de anticuerpos descritas en el presente documento.

- 5 Se apreciará que, aunque no se necesita saber el estado del JCV de un sujeto, puede ser útil saber el estado en algunos casos. En algunos casos, la eficacia de un tratamiento o terapia de este tipo se puede monitorizar detectando y/o monitorizando la presencia de JCV en un sujeto.

- En algunos casos, una o más composiciones de anticuerpos se pueden administrar a un sujeto antes, durante y/o después de que el sujeto reciba una terapia inmunomoduladora (por ejemplo, un tratamiento que inhibe el sistema inmune de un sujeto). Por consiguiente, en algunos casos, uno o más compuestos descritos en el presente documento como eficaces para inhibir la replicación del virus JC se pueden administrar a un sujeto antes de iniciar una terapia inmunomoduladora. Por ejemplo, un régimen terapéutico de una o más composiciones de la descripción se puede iniciar antes de un tratamiento inmunomodulador contra una enfermedad o en preparación para un trasplante para evitar o reducir el riesgo de replicación o proliferación del virus JC asociada al tratamiento inmunomodulador.

- En algunos casos, una o más composiciones de la descripción se pueden administrar solas o en combinación con otras composiciones descritas en el presente documento o junto con otros agentes terapéuticos (por ejemplo, uno o más agentes terapéuticos inmunosupresores). Las composiciones de la descripción se pueden proporcionar (por ejemplo, administrar) en preparaciones farmacéuticas. Las composiciones de la descripción se pueden proporcionar en kits.

- En algunos casos, un sujeto que está en tratamiento con (o que va a empezar un tratamiento con) un agente inmunosupresor se somete a prueba para uno o más indicios de infección por JCV. Si se detectan uno o más indicios de infección por JCV, el sujeto se puede evaluar para la presencia de una o más variantes de JCV asociadas a LMP tal como se describe en el presente documento. Si no se detectan indicios para JCV, el sujeto se puede monitorizar conforme avanza el tiempo, por ejemplo, cada 4 semanas, mensualmente, cada tres meses, cada 4 meses, cada 6 meses, cada 12 meses, para la presencia de cualquier indicio de infección por JCV. Si

- se detecta una infección por JCV, el sujeto se puede evaluar además para la presencia de una o más variantes de JCV. Si se detecta una variante de JCV asociada a riesgo aumentado de LMP, el sujeto se puede monitorizar además para detectar cualquier signo precoz de LMP y/o el régimen de tratamiento se puede alterar como se describe más detalladamente en el presente documento.

- En algunos casos, un anticuerpo neutralizante puede ser útil para ralentizar la evolución de una afección (por ejemplo, LMP) que se asocia a una infección por JCV. En algunos casos, un retraso en la evolución de LMP u de otra afección asociada a JCV permite una respuesta inmune del sujeto para luchar contra la infección por JCV. Por ejemplo, si a un sujeto que está con inmunoterapia o en 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 estadio temprano), entonces el sujeto se puede tratar administrándole una o más composiciones de anticuerpos descritas en el presente documento. En algunos casos, el tratamiento con inmunoterapia o con un fármaco que es inmunosupresor se reduce o se para durante el periodo de tiempo en el que se administra el anticuerpo neutralizante de JCV. Esto puede permitir al sistema inmune del sujeto recuperarse y ayudar a luchar contra la infección por JCV o contra la evolución de la enfermedad.

- Ácidos nucleicos que codifican casos de anticuerpos:

- En algunos casos, la siguiente secuencia de ácidos nucleicos se utilizó para codificar una cadena pesada de anticuerpo neutralizante:

atggacttcggcctgtcctgggtgttctgtgtgctgaaggcggtgcagtgccaggtgcagctgggtggaatccggcggtggc
gtggtgcagcctggcagatccctgagactgtctgcgccgctccggcttctcttcgaccggaactactggatcgcctgggtccgac
agggccctggcaagggactggaatgggtggccgccatctccgctggcggtccggcaacacctactacgccacctgggccaaggg
ccgggtcaccatctcccgggacaactccaagaacacctgtacctgcagatgaactccctggggccgaggacaccggctgtacta
ctgcgccgggttctacagcggcgaggctactacgccggctacttaccctgtggggccaggggcacctggtcaccgtgtcctccgc
ctctaccaaggggccctccgtgttccctgtggccccctccagcaagtccacctctggcgggcaccggcgctgtgggtgcctgtcaag
gactacttccccgaaccgggtgacgggtgctgtggaactcaggcgccctgaccagcggcggtgcacaccttcccgggtgtcctacagtct
caggacttactccctcagcagcgtgtgaccgtgccctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagc
ccagcaacaccaagggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaagactcacacatgccaccgtgccagcactgaactcc
tgggggggaccgtcagttcttcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtgtgtgt
ggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactgtgtacgtggacggcggtggaggtgcataatgccaaagacaagccggg
gaggagcagtaacaagcagcgtaccgtgtgtgtcagcgtctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagt
caaggtctccaacaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcgagccccgagaaccacaggtgtac
acctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccagggtcagcctgacctgcctgtgtaaaaggcttctatcccagcgacatcgcc
gtggagtgggagagcaatgggcagccgggagacaactacaagaccacgcctcccggtgttgactccgacggctccttctctac
agcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgttctctcatgtccgtgatgcagtgaggtctgcacaaccactac
acgcagaagagccttctccctgtctcccggtga

(SEQ ID NO:70)

- 5 En algunos casos, la siguiente secuencia de ácidos nucleicos se utilizó para codificar una cadena ligera de anticuerpo neutralizante:

atgagggtccccgtcagctcctggggctccttctgtctgtggtccctggagccagatgtgccttccagctgacccagtcccccagctc
cctgtctgcctccgtggcgacagagtgaccatcaactgtcaggcctccagtcctcggcggaacctggcctgtatcagcagaa
gccccgcaaggcccccaagctgtgatctacctggcctcctacctggccaagcgcggtgccctccagattctcggctctggctccgg
caccagtttaccctgaccgtgtccagcctgcagcccagggaacttggccacctactactgccagtcctcctactactcccccaacgaca
acgccttcggccagggcaccaaggtggaaatcaagcgtacgggtggctgcacctctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttg
aaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgtgaataacttctatccagagaggccaaagtacagtggaaagggtggataacgccctcca
atcgggtaactcccaggagagtgatcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgtgagcaaa
gcagactacgagaacacaaaagtctacgcctgcgaagtcacctcagggcctgagctcggcgtcacaaagagcttaacagggg
agagtgttag

- 10 (SEQ ID NO:71).

Líneas celulares útiles para expresión de los anticuerpos:

En algunas realizaciones, uno o más anticuerpos neutralizantes se pueden expresar en células CHO y HEK293. Sin embargo, se puede utilizar cualquier línea celular adecuada.

5

Vías de administración:

En algunos casos, la descripción proporciona métodos para inhibir la replicación viral, los métodos comprenden poner en contacto la célula que comprende un virus JC con una composición de anticuerpos.

10

En algunos casos, un anticuerpo o una preparación de anticuerpos se administra por vía intravenosa. En otros casos, un anticuerpo o una preparación de anticuerpos se administra por vía oral. Las vías alternativas de administración incluyen administraciones por vía sublingual, intramuscular y transdérmica. Por consiguiente, las preparaciones de la presente descripción se pueden administrar por vía oral, parenteral, tópica o rectal. Por supuesto, se administran en formas adecuadas para cada vía de administración.

15

Las expresiones "administración parenteral" y "administración por vía parenteral", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal, e infusión.

20

Las expresiones "administración sistémica", "administración por vía sistémica", "administración periférica" y "administración por vía periférica", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a la administración de un anticuerpo, fármaco u otro material que no sea directamente en el sistema nervioso central, de modo que entre en el sistema del paciente y, por lo tanto, esté sujeto al metabolismo y a otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

25

Estas composiciones de anticuerpos se pueden administrar a seres humanos y a otros animales para terapia mediante cualquier vía de administración adecuada. Los niveles reales de dosificación de los anticuerpos neutralizantes se pueden ajustar para obtener una cantidad que es eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición, y modo de administración, sin que sea tóxico para el paciente.

30

El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del anticuerpo particular, la tasa de aclaramiento del anticuerpo, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con el anticuerpo particular, la edad, sexo, peso, estado, salud general e historial médico previo del paciente que se trata, y factores similares conocidos en las técnicas médicas.

35

Un médico o veterinario con experiencia ordinaria en la técnica puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición de anticuerpos requerida. Por ejemplo, el médico o el veterinario puede comenzar con dosis de las composiciones de anticuerpos a niveles menores de los requeridos para alcanzar el efecto terapéutico deseado y entonces aumentar gradualmente la dosificación hasta que se alcance el efecto deseado.

40

En algunos casos, la composición de anticuerpos de la descripción se proporciona a un sujeto de manera crónica. Los tratamientos crónicos incluyen cualquier forma de administración repetida durante un periodo de tiempo prolongado, como administraciones repetidas durante uno o más meses, entre un mes y un año, uno o más años, o durante más tiempo. En algunos casos, un tratamiento crónico implica administrar composiciones de anticuerpos de la descripción repetidamente durante la vida del sujeto. En determinados casos, los tratamientos crónicos implican administraciones regulares, por ejemplo, una o más veces al día, una o más veces a la semana, o una o más veces al mes. En general, una dosis adecuada tal como una dosis diaria de composiciones de anticuerpos de la descripción será la cantidad que es la dosis eficaz más baja para producir un efecto terapéutico. Una dosis eficaz de este tipo en general dependerá de los factores que se han descrito anteriormente. En algunos casos, se puede utilizar al menos 0,5-1 mg/kg. Sin embargo, se pueden utilizar cantidades mayores o menores. En algunos casos, una dosis eficaz de un anticuerpo descrito en el presente documento puede ser aproximadamente 100mg/kg o más. En algunos casos, se puede utilizar de 300 a 600 mg/kg.

45

50

55

Las preparaciones de anticuerpos neutralizantes se pueden formular para administración de cualquier forma conveniente para su uso en medicina humana o veterinaria, por analogía con otros anticuerpos. En algunos casos, los aspectos de la descripción se refieren también a un método para hacer un medicamento para su uso para tratar a un sujeto, por ejemplo, para tratar o evitar una infección por JCV, o para inhibir la replicación o proliferación de JCV. Las preparaciones de este tipo se pueden utilizar para tratamiento profiláctico de un sujeto en riesgo o sospechoso de tener una infección por JCV o que está en riesgo de LMP (por ejemplo, para tratamiento de un sujeto antes, durante y/o

60

- después de que el sujeto reciba una terapia inmunomoduladora). Por consiguiente, una o más composiciones de anticuerpos descritas en el presente documento que modulan la replicación o proliferación del virus con ADN, tal como se describe en el presente documento, se pueden utilizar para preparar un medicamento para su uso en cualquiera de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento. En algunos casos, la descripción proporciona el uso
- 5 de una o más composiciones de anticuerpos de la descripción (por ejemplo, identificadas por inhibir la replicación de JCV) para fabricar un medicamento o fármaco para tratar a un mamífero (por ejemplo, un ser humano) que tiene uno o más síntomas, o en riesgo, de infección, replicación y/o proliferación de JCV (por ejemplo, uno o más síntomas de actividad de JCV). Por consiguiente, los aspectos de la descripción se refieren al uso de una o más composiciones de anticuerpos descritas en el presente documento para preparar un medicamento para tratar o evitar LMP en un sujeto.
- 10 Por consiguiente, la descripción se refiere también a una o más composiciones de anticuerpos descritas en el presente documento para su uso como medicamento. La descripción se refiere también a una o más de estas composiciones de anticuerpos para su uso en los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, en métodos para inhibir la replicación de JCV, o para tratar o evitar una enfermedad asociada a la replicación o proliferación de JCV (por ejemplo, en sujetos que están a punto de ser tratados, que están en tratamiento y/o que se han tratado con al menos una
- 15 composición inmunomoduladora).

Aplicaciones diagnósticas y kits:

- En algunos casos, los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden utilizar como reactivos de detección
- 20 para diagnósticos *in vivo* y/o acoplados a reactivos de colorantes de contraste para radiología.

- En algunos casos, los aspectos de la descripción incluyen utilizar anticuerpos anti-JCV (por ejemplo, anticuerpos de unión a VP-1) inmovilizados o no inmovilizados como restos de detección para evaluar la presencia y/o nivel de JCV en una muestra. Los ensayos de detección pueden incluir el uso de uno o más restos de detección marcados (por
- 25 ejemplo, un anticuerpo de unión a VP-1 que contiene o está fijado a un marcador detectable). Un marcador detectable se define como cualquier resto que se puede detectar utilizando un ensayo. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos funcionales de la descripción se pueden acoplar a los agentes de marcado específicos para detectar la unión según los procedimientos de acoplamiento estándar. Se puede utilizar una amplia variedad de marcadores detectables tales como los que proporcionan una detección directa (por ejemplo, un marcador radiactivo, un fluoróforo
- 30 [por ejemplo, proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP), etc.], un cromóforo, un marcador denso óptico o electrónico, etc.) o una detección indirecta (por ejemplo, una etiqueta de enzima tal como peroxidasa de rábano picante, etc.). Los ejemplos no limitativos de marcadores detectables que se han unido a o incorporado en anticuerpos incluyen: enzimas, radiomarcadores, marcadores fluorescentes, moléculas fosforescentes, moléculas quimioluminiscentes, cromóforos, moléculas luminiscentes, moléculas de fotoafinidad, y partículas de color o ligandos
- 35 tales como biotina, etc. En algunos casos, los métodos de detección de la descripción pueden incluir métodos de electroquimioluminiscencia (ECL).

- Se puede utilizar una variedad de métodos para detectar un marcador, dependiendo de la naturaleza del marcador y otros componentes del ensayo. Los marcadores se pueden detectar directamente a través de densidad óptica o
- 40 electrónica, emisiones radiactivas, transferencias de energía no radiactiva, etc., o se pueden detectar indirectamente con conjugados de anticuerpos, conjugados de estreptavidina-biotina, etc. Muchos marcadores detectables adicionales son conocidos en la técnica, como lo son los métodos para su fijación a los anticuerpos.

- Los anticuerpos marcados pueden ser anticuerpos que se utilizan *in vitro*, por ejemplo, en un inmunoensayo tal como
- 45 un ELISA. Los anticuerpos marcados de forma detectable de este tipo pueden ser anticuerpos que tienen un marcador detectable incorporado en el anticuerpo, o pueden ser anticuerpos que están unidos a un ligando de unión secundario y/o a una enzima (una etiqueta de enzima) que generarán un producto detectable (por ejemplo, coloreado) tras el contacto con un sustrato cromogénico. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, ureasa, fosfatasa alcalina, hidrógenoperoxidasa (de rábano picante) o glucosa oxidasa. Los ejemplos de ligandos de unión
- 50 secundarios adecuados incluyen, pero no se limitan a, compuestos de biotina y/o avidina y estreptavidina. El uso de marcadores de este tipo es bien conocido por los expertos en la técnica y se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N.º 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241

- Se conocen en la técnica numerosos métodos para la fijación o conjugación de un anticuerpo a su marcador
- 55 detectable. Un método de fijación puede incluir el uso de un complejo de quelato metálico que emplea, por ejemplo, un agente quelante orgánico tal como anhídrido de ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA); ácido etilentriaminetetraacético; N-cloro-p-toluenosulfonamida; y/o tetracloro-3alfa-6alfa. difenilglicouril-3 fijado al anticuerpo (Patentes de Estados Unidos N.º 4.472.509 y 4.938.948). Los anticuerpos monoclonales también se pueden hacer reaccionar con una enzima en presencia de un agente de acoplamiento tal como glutaraldehído o peryodato. Los
- 60 anticuerpos pueden marcarse con marcadores de fluoresceína en presencia de estos agentes de acoplamiento o mediante la reacción con un isotiocianato. En otros casos, los anticuerpos pueden marcarse mediante derivatización, por ejemplo, mediante la introducción selectiva de grupos sulfhidrilo en la región Fc del anticuerpo, utilizando

condiciones de reacción que no alteren el sitio de reconocimiento de anticuerpos.

La detección del marcador detectable en un ensayo de la descripción también se denomina en el presente documento como detectar la "señal". Los métodos para detectar la señal en un inmunoensayo se conocen bien en la técnica. En algunos casos, una señal de ensayo puede ser detectada utilizando un lector de placas de múltiples pocillos (por ejemplo, lector de microplacas) para evaluar la cantidad y/o ubicación de una señal. La detección de la señal puede ser la detección óptica u otros medios de detección adecuados para detectar un marcador detectable utilizado en la descripción.

- 10 La presente invención se ilustra además por medio de los siguientes Ejemplos, que, de ninguna manera, se deberían interpretar como limitativos adicionales.

EJEMPLOS

15 *Ejemplo 1: Anticuerpo y secuencias de CDR*

Los anticuerpos R399 y R411 se generaron por medio de inmunización de un conejo con partículas similares a virus (VLP) de JCV. Las VLP se utilizan para la inmunización contenida en una mutación L55F en un fondo MAD1. El bazo de uno de los cuatro ratones se utilizó para generar anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos que se generaron se examinaron para inhibición de la infectividad incluidos los anticuerpos R117, R322, R399, R411 y R497. Los anticuerpos seleccionados se examinaron para su capacidad de unirse a VLP mutantes y R399 se seleccionó como inhibidor potente con amplia especificidad a mutantes virales conocidos. Los anticuerpos R399 y R411 se seleccionaron para clonación y humanización. La humanización dio lugar a 3 cadenas ligeras y 10 cadenas pesadas para R399 y R411.

25

Secuencias basadas en 399

V-ligeras de 399 y CDR (subrayadas)

30 SEQ ID NO:1 399_vl

AFELTQTPASVEAAVGGT¹VTINCQASQSIGNNLAWYQQKPGQPPKLLIYLASYLASGVSSRFKSGSGTQFTLTV
SALECADAAATYYCQSSYYSPNDNAFGGGTEVVVR

SEQ ID NO:2 399_v1_CDR1

35

SEQ ID NO:3 399_v1_CDR2

40 SEQ ID NO:4 399_v1_CDR3

Marco del aceptor humano de V-ligera (CDR subrayadas)

SEQ ID NO:5 huIGKV1-13x02

45

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTIT
SSLQPEDFATYYCQQFNSTP---FGQGTKVEIK

V-pesadas de 399 y CDR (subrayadas)

50 SEQ ID NO:6 399_vh

-QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTVSGFSFDRNYWICWIRQAPGMGLEWAACISAGGSGNTYYATWAKGRFTISK
SS-TTVTLQMASLTAADTATYFCARFYSGGGYYAGYFTLWGPGTLTVSS

SEQ ID NO:7 399_vh_CDR1

55

GFSFDRNYWIC

SEQ ID NO:8 399_vh_CDR2

CISAGGSGNTYYATWAKG

5

SEQ ID NO:9 399_vh_CDR3

FYSGGGYYAGYFTL

10 Marco del aceptor humano de V-pesada (CDR subrayadas)

SEQ ID NO:10 IGHV3-30-3x01

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSS-YAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD-GSNKYYADSVKG
RFETISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR-----WGQGTLVTVSS

15

Diseños humanizados para 399

- Cadena ligera: marco hulgKV1-13x02 // CDR de VL de 399

20 - Cadena pesada: marco IGHV3-30-3x01 // CDR de VH de 399

- Las retromutaciones de marco están en fuente negra en minúsculas y resaltadas. Las CDR, según la definición de Chothia, están subrayadas.

25 Todos los posibles pares o cadenas de R399 humanizadas se examinaron para unión a VLP de JCV MAD1. Todos se unieron con alta afinidad y la versión de HOLO injertada con CDR se seleccionó como candidato. Esa molécula se sometió a ensayo para unión a una variedad de VLP mutantes y se observaron diferencias en afinidad de unión en algunos mutantes. La mayoría de las variantes descritas tuvieron poco o ningún efecto en la unión y fueron perjudiciales. Alguna unión mejorada y, en particular, la variante de cadena ligera N31A tuvo una unión mejorada de
 30 manera significativa a la VLP mutante de VP1 S269F.

Con frecuencia, los anticuerpos de conejo contienen regiones puente de enlaces disulfuro de la región variable de cadena pesada desde el aminoácido cys35 al aminoácido cys50 (Las numeraciones cys35 y cys50 se refieren a la secuencia de conejo original. Cys35 y Cys50 se corresponden con las posiciones 36 y 51, respectivamente, en las
 35 secuencias de marco humanizadas). Las cisteínas se eliminaron en la versión injertada con CDR de R399 humanizado, lo que contribuye a la pérdida de afinidad con las VLP de 269F. Esas sustituciones fueron C35A y C50V, respectivamente. Para eliminar el disulfuro, se generó la C50A (a través de generación de V50A en la molécula injertada con CDR) y no se encontró pérdida de afinidad con las VLP de 269F. Las versiones de N31A de cadena ligera y V50A de cadena pesada en el fondo H0L2 se combinaron para generar el anticuerpo "50/31-A". El anticuerpo
 40 50/31-A tiene una unión recuperada a las VLP de 269F y ningún cambio significativo en la unión a otros mutantes. Sin embargo, 50/31-A reconoce muy poco las VLP de S269Y. Suponiendo que existía un problema de impedimento estérico, se generó la variante V50G de cadena pesada y se combinó con L2-N31A para proporcionar el anticuerpo "50/31-G". El anticuerpo 50/31-G se une a 269F y a Y, y no tiene ningún cambio significativo en la unión a otros mutantes.

45

SEQ ID NO:11 L0 = injerto de CDR

AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQSIGNNLAWYQQKPGKAPKLLIYLASYLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQSSYYSPNDNAFGQGTKVEIK

50 SEQ ID NO:12 L1

AfQLTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQSIGNNLAWYQQKPGKAPKLLIYLASYLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQSSYYSPNDNAFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:13 L2

55

AfQLTQSPSSLSASVGDRVTInCQASQSIGNNLAWYQQKPGKAPKLLIYLASYLASGVPSRFSGSGSGTqFTLTv
SSLQPEDFATYYCQSSYYSPNDNAFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:14 L2 N31A

AfQLTQSPSSLSASVGDRVTInCQASQSIGANLAWYQQKPGKAPKLLIYLASYLASGVPSRFSGSGSGTqFTLTv
SSLQPEDFATYYCQSSYYSPNDNAFGQGTKVEIK

5

SEQ ID NO:15 L2 N31G

AfQLTQSPSSLSASVGDRVTInCQASQSIGGNLAWYQQKPGKAPKLLIYLASYLASGVPSRFSGSGSGTqFTLTv
SSLQPEDFATYYCQSSYYSPNDNAFGQGTKVEIK

10

SEQ ID NO:16 399_v1_CDR1 N31A

QASQSIGANLA

15 SEQ ID NO:17 399_v1_CDR1 N31G

QASQSIGGNLA

SEQ ID NO:18 399_v1_CDR1 N31X

20

QASQSIGXNLA

SEQ ID NO:19 H0 = injerto de CDR

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFDRNYWIAWVRQAPGKGLEWVAVISAGGSGNTYYATWAKGRFTISR
25 NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFYSGGGYYAGYFTLWGQGTlVTVSS

SEQ ID NO:20 H0 V50A

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFDRNYWIAWVRQAPGKGLEWVAVISAGGSGNTYYATWAKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFYSGGGYYAGYFTLWGQGTlVTVSS

30

SEQ ID NO:21 H0 V50G

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFDRNYWIAWVRQAPGKGLEWVAGISAGGSGNTYYATWAKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFYSGGGYYAGYFTLWGQGTlVTVSS

35 SEQ ID NO:22 H1

QVQLVqSGGGVVQPGRSLRLSCAvSGFSFDRNYWIAWVRQAPGKGLEWVAVISAGGSGNTYYATWAKGRFTISKD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFYSGGGYYAGYFTLWGQGTlVTVSS

SEQ ID NO:23 H2

40

QVQLVqSGGGVVQPGesLRLSCAvSGFSFDRNYWIAWiRQAPGKLEWaaVISAGGSGNTYYATWAKGRFTISKD
NSKNTvYLQMNSLRAEDTAVYfCARFYSGGGYYAGYFTLWGQGTlVTVSS

SEQ ID NO:24 H3

QVQLVqSGGGVVQPGesLRLSCAvSGFSFDRNYWIsWiRQAPGKLEWaaVISAGGSGNTYYATWAKGRFTISKD
NSKNTvYLQMNSLRAEDTAVYfCARFYSGGGYYAGYFTLWGQGTlVTVSS

45

SEQ ID NO:25 H4

QVQLVQSGGGVVPQGESLRRLSCAVSGFSFDRNYWIAWIRQAPGKGLEWAAVISAGGSGNTYYATWAKGRFTISKD
NSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARFYSGGGYYAGYFTLWGQGLTVTVSS

5

SEQ ID NO:26 H5

Q-QLVQSGGGVVPQGESLRRLSCAVSGFSFDRNYWIAWIRQAPGKGLEWAAVISAGGSGNTYYATWAKGRFTISKD
NSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARFYSGGGYYAGYFTLWGQGLTVTVSS

10 SEQ ID NO:27 H6

QVQLVQSGGGVVPQGESLRRLSCAVSGFSFDRNYWIAWIRQAPGKGLEWAAVISAGGSGNTYYATWAKGRFTISKt
ss-tTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARFYSGGGYYAGYFTLWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:28 H7

15

Q-QLVQSGGGVVPQGESLRRLSCAVSGFSFDRNYWIAWIRQAPGKGLEWAAVISAGGSGNTYYATWAKGRFTISKt
ss-tTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARFYSGGGYYAGYFTLWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:29 H8

Q-QLVQSGGGVVPQGESLRRLSCAVSGFSFDRNYWIAWIRQAPGKGLEWAAVISAGGSGNTYYATWAKGRFTISKt
20 ss-tTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARFYSGGGYYAGYFTLWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:30 H9

Q-QLVQSGGGVVPQGESLRRLSCAVSGFSFDRNYWIAWIRQAPGKGLEWAAVISAGGSGNTYYATWAKGRFTISKt
ss-tTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARFYSGGGYYAGYFTLWGQGLTVTVSS

25

SEQ ID NO:31 399_vh_CDR1 C35A

GFSFDRNYWIA

30 SEQ ID NO:32 399_vh_CDR1 C35S

GFSFDRNYWIS

SEQ ID NO:33 399_vh_CDR1 C35X

35

GFSFDRNYWIX

SEQ ID NO:34 399_vh_CDR2 C50V

40 VISAGGSGNTYYATWAKG

SEQ ID NO:35 399_vh_CDR2 C50A

AISAGGSGNTYYATWAKG

45

SEQ ID NO:36 399_vh_CDR2 C50G

GISAGGSGNTYYATWAKC

50 SEQ ID NO:37 399_vh_CDR2 C50X

XISAGGSGNTYYATWAKG

MUTACIONES EN VL remodelado

L0 a L1

- 5 - I2F Este residuo canónico podría afectar a la conformación de CDR L1.

L1 a L2

- 10 - T22N Este residuo se expone en la superficie cerca de CDR L1 y puede entrar en contacto con el antígeno.
 - D70Q Este residuo se expone en la superficie cerca de CDR L1 y puede entrar en contacto con el antígeno.
 - I75V Este residuo se oculta en el núcleo y puede afectar a la estructura del dominio VL.
 15 Esta posición se puede traducir a la numeración de Kabat

MUTACIONES EN VH remodelado

H0 a H1

- 20 - E6Q Esta mutación oculta tiene estabilidad del dominio VH mejorada en otros anticuerpos.
 - A24V Este residuo canónico puede afectar a la conformación de CDR H1.
 25 - R71K Este residuo canónico puede afectar a la conformación de CDR H2.

H1 a H2

- 30 - R16E Esta mutación oculta tiene estabilidad del dominio VH mejorada en otros anticuerpos.
 - V37I Este residuo se localiza en la interfaz del dominio VH/VL y puede afectar al apareamiento de cadena pesada/ligera.
 - V48A Este residuo oculto puede afectar a la estructura de CDR H2.
 35 - L78V Este residuo oculto puede afectar a la estructura de CDR H1.
 - Y91F Este residuo se localiza en la interfaz del dominio VH/VL y puede afectar al apareamiento de cadena pesada/ligera.

40

Constructos H3-H9

Hay varias características inusuales de los dominios VH de conejo que no se observan en los dominios VH humanos. Estas características incluyen:

45

• **N-terminal acortado.** En este dominio VH de conejo, el marco 1 es más corto por un residuo que el dominio VH humano típico. En lugar de una retromutación, algunos constructos humanizados se hicieron más similares al 399 de conejo al suprimir Val2. Los V2Δ mutantes están resaltados en los constructos anteriores.

- 50 • **Marco 3 acortado.** En este dominio VH de conejo, el marco 3 también es más corto por un residuo que el marco 3 de la mayoría de los dominios VH humanos conocidos. Ya que la región de bucle del marco 3 cercana a CDR 1 a veces puede reconocer el antígeno, esta región de constructos humanizados se ha acortado y reemplazado con la secuencia de conejo. Las mutaciones/delecciones combinadas (D72T/N73S/K75Δ/N76T) se utilizaron para hacer esta región del dominio VH más similar a la de 399 de conejo. Las regiones de marco 3 acortadas están resaltadas en los constructos
 55 anteriores.

• **Enlace disulfuro entre Cys35a y Cys50.** El enlace disulfuro no sucede en los dominios VH humanos. Los residuos Cys35a y Cys50 se reemplazaron con Ser/Ala y Val, respectivamente, en algunos constructos. Estos aminoácidos están resaltados en las secuencias anteriores.

60

Constructo	¿N-terminal acortado?	¿Marco 3 acortado?	Residuos de 35a a 50
H2	No	No	Ala, Val
H3	No	No	Ser, Val
H4	No	No	Cys, Cys
H5	Sí	No	Ala, Val
H6	No	Sí	Ala, Val
H7	Sí	Sí	Ala, Val
H8	Sí	Sí	Ser, Val
H9	Sí	Sí	Cys, Cys

Secuencias basadas en 411

V-ligeras de 411 y CDR

5

SEQ ID NO:38 jcv411_vl

AFELTQTITSPVSAAVGGTIVTIFCQASQSIGNNLAWYQQKPGQPPLLIYLASYLASGVPSRFKGS~~SGSGTQFTLTV~~
SALECADAAAYYCQSAYYSPNDNAFGGGTEVVVR

10 Marco aceptor humano

SEQ ID NO:39 IGKV1D-13x01

AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCQASQSIGNNLAWYQQKPGKAPKLLIYLASYLASGVPSRFS~~SGSGTDFTLTI~~
SSLQPEDFATYYCQSAYYSPNDNAFGGQTKVEIK

15

SEQ ID NO:40 jcv411_vl_CDR1

QASQSIGNNLA

20 SEQ ID NO:41 jcv411_vl_CDR2

LASYLAS

SEQ ID NO:42 jcv411_vl_CDR3

25

QSAYYSPNDNA

V-pesadas de 411 y CDR

30 SEQ ID NO:43 jcv411_vh

QSSLEESGGDLVKPGASLTILCTASGFSFDRNYWMQWVRQAPGMGLEWAAQIAAGGNGNTIYATWAKGRFTISK
SSTITVTLQMASLTAADTATYFCARFYNGGGYYAGYFTLWGPGLTVTVSS

SEQ ID NO:44 IGHV3-30-3x01

35

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSS-YAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD-GSNKYYADSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR-----WGQGTILTVTVSS

Marco aceptor humano

40 SEQ ID NO:45 jcv411_vh_CDR1

GFSFDRNYWMC

SEQ ID NO:46 jcv411_vh_CDR2

5 CIAAGGNGNTYYATWAKG

SEQ ID NO:47 jcv411_vh_CDR3

FYNGGGYYAGYFTL

10

Humanización de diseños para 411

- Cadena ligera: arco IGKV1D-13x01 // CDR de jcv411_vl

15 - Cadena pesada: marco IGHV3-30-3x01 // CDR de jcv411_vh

- Las retromutaciones de marco están en fuente negrita en minúsculas y resaltadas. Las CDR, según la definición de Chothia, están subrayadas.

20 SEQ ID NO:48 L0 = injerto de CDR

AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQSIGNNLAWYQQKPGKAPKLLIYLASYLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTII
SSLQPEDFATYYCQSAYYSPNDNAFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:49 L1

25

A**f**QLTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQSIGNNLAWYQQKPGKAPKLLIYLASYLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTII
SSLQPEDFATYYCQSAYYSPNDNAFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:50 L2

A**f**QLTQSPSSLSASVGDRVIT**f**CQASQSIGNNLAWYQQKPGKAPKLLIYLASYLASGVPSRFSGSGSGT**q**FTLT**v**
SSLQPEDFATYYCQSAYYSPNDNAFGQGTKVEIK

30

SEQ ID NO:51 H0 = injerto de CDR

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFSFDRNYWMAWVRQAPGKGLEWVA**AVIAAGGSGNTYYATWAKGRFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFYSGGGYYAGYFTLWGQTLTVSS

35

SEQ ID NO:52 H1

QVQLV**q**SGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFSFDRNYWMAWVRQAPGKGLEWVA**AVIAAGGSGNTYYATWAKGRFTIS**kD**
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFYSGGGYYAGYFTLWGQTLTVSS

40 SEQ ID NO:53 H2

QVQLV**q**SGGGVVQP**G**SLRLSCAAS**GFSFDRNYWMAWVRQAPGKLEW**aAVIAAGGSGNTYYATWAKGRFTIS**kD**
NSKNT**v**YLQMNSLRAEDTAVY**f**CARFYSGGGYYAGYFTLWGQTLTVSS

SEQ ID NO:54 H3

45

QVQLV**q**SGGGVVQP**G**SLRLSCAAS**GFSFDRNYWMAWVRQAPGKLEW**aAVIAAGGSGNTYYATWAKGRFTIS**kD**
NSKNT**v**YLQMNSLRAEDTAVY**f**CARFYSGGGYYAGYFTLWGQTLTVSS

SEQ ID NO:55 H4

QVQLV**q**SGGGVVQP**Ge**SLRLSCAAS**GFS**FDRNYW**Mc**WVRQAPGKGLEW**aac**IAAGGSGNTYYATWAKGRFTIS**kd**
NSKNT**v**YLQMNSLRAEDTAVY**f**CARFYSGGGYYAGYFTLWGQGTILVTVSS

SEQ ID NO:56 H5

Q-QLV**q**SGGGVVQP**Ge**SLRLSCAAS**GFS**FDRNYW**MA**WVRQAPGKGLEW**a**AVIAAGGSGNTYYATWAKGRFTIS**kd**
NSKNT**v**YLQMNSLRAEDTAVY**f**CARFYSGGGYYAGYFTLWGQGTILVTVSS

5

SEQ ID NO:57 H6

QVQLV**q**SGGGVVQP**Ge**SLRLSCAAS**GFS**FDRNYW**MA**WVRQAPGKGLEW**a**AVIAAGGSGNTYYATWAKGRFTIS**kt**
ss-t**v**YLQMNSLRAEDTAVY**f**CARFYSGGGYYAGYFTLWGQGTILVTVSS

10

SEQ ID NO:58 H7

Q-QLV**q**SGGGVVQP**Ge**SLRLSCAAS**GFS**FDRNYW**MA**WVRQAPGKGLEW**a**AVIAAGGSGNTYYATWAKGRFTIS**kt**
ss-t**v**YLQMNSLRAEDTAVY**f**CARFYSGGGYYAGYFTLWGQGTILVTVSS

15 SEQ ID NO:59 H8

Q-QLV**q**SGGGVVQP**Ge**SLRLSCAAS**GFS**FDRNYW**Ms**WVRQAPGKGLEW**a**AVIAAGGSGNTYYATWAKGRFTIS**kt**
ss-t**v**YLQMNSLRAEDTAVY**f**CARFYSGGGYYAGYFTLWGQGTILVTVSS

SEQ ID NO:60 H9

20

Q-QLV**q**SGGGVVQP**Ge**SLRLSCAAS**GFS**FDRNYW**Mc**WVRQAPGKGLEW**aac**IAAGGSGNTYYATWAKGRFTIS**kt**
ss-t**v**YLQMNSLRAEDTAVY**f**CARFYSGGGYYAGYFTLWGQGTILVTVSS

SEQ ID NO:61 jcv411_vh_CDR1 C35A

25

GFSFDRNYWMA

SEQ ID NO:62 jcv411_vh_CDR1 C35S

GFSFDRNYWMS

30

SEQ ID NO:63 jcv411_vh_CDR1 C35X

GFSFDRNYWMX

35 SEQ ID NO:64 jcv411_vh_CDR2 C50V

VIAAGGSGNTYYATWAKG

SEQ ID NO:65 jcv411_vh_CDR2 C50X

40

XIAAGGSGNTYYATWAKG

MUTACIONES EN VL remodelado

45 L0 a L1

- I2F Este residuo canónico podría afectar a la conformación de CDR L1.

L1 a L2

50

- T22F Este residuo se expone en la superficie cerca de CDR L1 y puede entrar en contacto con el antígeno.

- D70Q Este residuo se expone en la superficie cerca de CDR L1 y puede entrar en contacto con el antígeno.

- I75V Este residuo se oculta en el núcleo y puede afectar a la estructura del dominio VL.

5

MUTACIONES EN VH remodelado

H0 a H1

10 - E6Q Esta mutación oculta tiene estabilidad del dominio VH mejorada en otros anticuerpos.

- R71K Este residuo canónico puede afectar a la conformación de CDR H2.

H1 a H2

15

- R16E Esta mutación oculta tiene estabilidad del dominio VH mejorada en otros anticuerpos.

- V48A Este residuo oculto puede afectar a la estructura de CDR H2.

20 - L78V Este residuo oculto puede afectar a la estructura de CDR H1.

- Y91F Este residuo se localiza en la interfaz del dominio VH/VL y puede afectar al apareamiento de cadena pesada/ligera.

25 Constructos H3-H9

Hay varias características inusuales de los dominios VH de conejo que no se observan en los dominios VH humanos. Estas características incluyen:

30 • **N-terminal acortado.** En este dominio VH de conejo, el marco 1 es más corto por un residuo que el dominio VH humano típico. En lugar de una retromutación, algunos constructos humanizados se hicieron más similares al 399 de conejo al suprimir Val2. Los V2A mutantes están resaltados en los constructos anteriores.

35 • **Marco 3 acortado.** En este dominio VH de conejo, el marco 3 también es más corto por un residuo que el marco 3 de la mayoría de los dominios VH humanos conocidos. Ya que la región de bucle del marco 3 cercana a CDR 1 a veces puede reconocer el antígeno, esta región de constructos humanizados se ha acortado y reemplazado con la secuencia de conejo. Las mutaciones/deleciones combinadas (D72T/N73S/K75Δ/N76T) se utilizaron para hacer esta región del dominio VH más similar a la de 399 de conejo. Las regiones de marco 3 acortadas están resaltadas en los constructos anteriores.

40

• **Enlace disulfuro entre Cys35a y Cys50.** El enlace disulfuro no sucede en los dominios VH humanos. Los residuos Cys35a y Cys50 se reemplazaron con Ser/Ala y Val, respectivamente, en algunos constructos. Estos aminoácidos están resaltados en las secuencias anteriores.

Constructo	¿N-terminal acortado?	¿Marco 3 acortado?	Residuos de 35a a 50
H2	No	No	Ala, Val
H3	No	No	Ser, Val
H4	No	No	Cys, Cys
H5	Sí	No	Ala, Val
H6	No	Sí	Ala, Val
H7	Sí	Sí	Ala, Val
H8	Sí	Sí	Ser, Val
H9	Sí	Sí	Cys, Cys

45

Ejemplo 2: Ensayo de neutralización

Los anticuerpos monoclonales derivados de conejo se sometieron a prueba en un ensayo de duplicación de astrocitos humanos para su capacidad de neutralizar los virus JCV y BKV. La capacidad de los anticuerpos de inhibir los virus y las células mostrados en la figura 1 (astrocitos humanos) y en la figura 2 (células epiteliales tubulares proximales renales humanas). La figura 3 proporciona una visión general de los valores EC₅₀, EC₈₀ y EC₉₀ de los anticuerpos 5 contra JCV y BKV en varios ensayos.

Ejemplo 3: Unión a JCV-VP1 de anticuerpos monoclonales derivados de conejo

Los anticuerpos monoclonales derivados de conejo se sometieron a prueba para su capacidad de unirse a la proteína 10 de tipo salvaje JCV-VP1 y a los siguientes mutantes de JCV-VP1; L55F, S269F, Q271H, K60E y D66H. Los estudios de unión se realizaron en un ensayo de ELISA. Los resultados se muestran en la figura 4.

Ejemplo 4: Unión a JCV-VP1 de versiones humanizadas de anticuerpos monoclonales derivados de conejo 399 como se determina por ELISA

15 Las CDR del anticuerpo monoclonal derivado de conejo 399 se injertaron en secuencias aceptoras de V-pesada y V-ligera humanizadas tal como se describe en el Ejemplo 1. La unión de los anticuerpos monoclonales de conejo 399 y los humanizados BIIB048 (= HOLO), H0_{V50A} L2_{N31A} y H0_{V50A} L2_{N31A} a un número de JCV-VP1 de tipo salvaje y mutante se evaluó utilizando ELISA. Los resultados se resumen en la figura 5.

20 *Ejemplo 5: Unión a JCV-VP1 de versiones humanizadas de anticuerpos monoclonales derivados de conejo 399 como se determina por experimentos de afinidad con Biacore*

25 Las CDR del anticuerpo monoclonal derivado de conejo 399 se injertaron en secuencias aceptoras de V-pesada y V-ligera humanizadas tal como se describe en el Ejemplo 1. La unión de los anticuerpos humanizados BIIB048 (= HOLO) y H0_{V50A} L2_{N31A} a un número de JCV-VP1 mutantes y de tipo salvaje se evaluó utilizando experimentos de afinidad con Biacore. Se determinó la unión de las versiones Fab y Mab de los anticuerpos. Los resultados se resumen en la figura 6.

30 *Ejemplo 6: Ensayo de infectividad*

La capacidad del anticuerpo HOLO de suprimir la infectividad del JCV se evaluó en varias concentraciones y se determinaron los IC₅₀ y IC₉₀ del anticuerpo. Los resultados se muestran en la figura 8.

35 *Ejemplo 7: Ensayo de infectividad con virus JCV-VP1 mutantes*

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos BIIB48 (HOLO) y hu399 50-31G (H0_{V50A} L2_{N31A}) PARA SUPRIMIR LA INFECTIVIDAD DE LOS MUTANTES DE JCV-VP1. Las condiciones del ensayo se proporcionan en la figura 9 y figura 10. La lectura de los experimentos se hizo por medio de Western Blot. Los resultados de los Western blot se muestran en las figuras 11-12 40 (exposición normal) y figuras 13-14 (sobreexposición).

Ejemplo 8: Unión de anticuerpos humanizados a virus JCV-VP1 mutantes

45 La capacidad de los anticuerpos BIIB48 (HOLO) y hu399 50-31G (H0_{V50A} L2_{N31A}) PARA UNIRSE A LOS DISTINTOS MUTANTES DE JCV-VP1 SE EVALUÓ POR MEDIO DE ELISA. Las condiciones del ensayo se proporcionan en la figura 15 y figura 16. Los valores EC₅₀ (en nM) se proporcionan en la figura 17.

Equivalentes:

50 La especificación escrita anteriormente se considera suficiente para permitir que un experto en la técnica ponga en práctica la invención. La presente invención no se debe limitar al alcance proporcionado por los ejemplos, ya que se pretende que los ejemplos sean una ilustración única de un aspecto de la invención y otras realizaciones funcionalmente equivalentes se encuentran dentro del alcance de la invención. Varias modificaciones de la invención además de aquellas mostradas y descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la técnica 55 a partir de la descripción anterior y entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BIOGEN IDEC MA INC.

60 <120> ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES DE JCV

<130> P43766EP-PCT

<140> EP13765090.9

<141> 15/03/2013

5

<150> US 61/613,214

<151> 20/03/2012

<160> 71

10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 109

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

20

<400> 1

```

Ala Phe Glu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Ala Ala Val Gly
 1             5             10             15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Asn
 20             25             30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35             40             45

Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
 50             55             60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Val Ser Ala Leu Glu Cys
 65             70             75             80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Tyr Tyr Ser Pro Asn
 85             90             95

Asp Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Arg
 100            105

```

25

<210> 2

<211> 11

30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> Polipéptido sintético

<400> 2

ES 2 731 757 T3

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 3

5 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <400> 3

Leu Ala Ser Tyr Leu Ala Ser
1 5

<210> 4

20

<211> 11

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

30

<400> 4

Gln Ser Ser Tyr Tyr Ser Pro Asn Asp Asn Ala
1 5 10

35 <210> 5

<211> 109

<212> PRT

40

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Polipéptido sintético

<220>

<221> variante

50

<222> (96).. (99)

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

55 <400> 5

ES 2 731 757 T3

Ala	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Ile	Ser	Ser	Ala
		20						25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Asp	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Phe	Asn	Ser	Tyr	Pro	Xaa
				85					90					95	
Xaa	Xaa	Xaa	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys			
			100					105							

<210> 6

5 <211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <220>

<221> variante

<222> (1)..(1)

20

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

<220>

25 <221> variante

<222> (78)..(78)

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

30

<400> 6

ES 2 731 757 T3

Xaa Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn
20 25 30

Tyr Trp Ile Cys Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Met Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ala Ala Cys Ile Ser Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Xaa Thr Thr
65 70 75 80

Val Thr Leu Gln Met Ala Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr
85 90 95

Phe Cys Ala Arg Phe Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Tyr Phe
100 105 110

Thr Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 7

5 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <400> 7

Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn Tyr Trp Ile Cys
1 5 10

<210> 8

20

<211> 18

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

30 <400> 8

Cys Ile Ser Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 9

5 <211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <400> 9

Phe Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Tyr Phe Thr Leu
1 5 10

<210> 10

20

<211> 125

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

30

<220>

<221> variante

35 <222> (32)..(32)

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

<220>

40

<221> variante

<222> (56)..(56)

45 <223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

<220>

<221> variante

50

<222> (101)..(114)

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

5 <400> 10

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Xaa
          20          25          30

Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
          35          40          45

Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Xaa Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp
          50          55          60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65          70          75          80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
          85          90          95

Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
          100          105          110

Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120          125

```

<210> 11

10

<211> 109

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

20

<400> 11

```

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1          5          10          15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Asn
          20          25          30

```

ES 2 731 757 T3

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Tyr Tyr Ser Pro Asn
85 90 95

Asp Asn Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 12

5 <211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <400> 12

Ala Phe Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Tyr Tyr Ser Pro Asn
85 90 95

Asp Asn Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 13

20

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 13

10

Ala	Phe	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Asn	Cys	Gln	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Asn	Asn
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Leu	Ala	Ser	Tyr	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Phe	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Ser	Tyr	Tyr	Ser	Pro	Asn
				85					90					95	
Asp	Asn	Ala	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys			
			100					105							

<210> 14

15 <211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Polipéptido sintético

25 <400> 14

ES 2 731 757 T3

Ala Phe Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ala Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Tyr Tyr Ser Pro Asn
 85 90 95

Asp Asn Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 15

<211> 109

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Polipéptido sintético

<400> 15

ES 2 731 757 T3

Ala Phe Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Gly Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Tyr Tyr Ser Pro Asn
 85 90 95

Asp Asn Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 16

5 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <400> 16

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ala Asn Leu Ala
 1 5 10

<210> 17

20

<211> 11

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

30

<400> 17

ES 2 731 757 T3

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Gly Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 18

5 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <220>

<221> variante

<222> (8)..(8)

20

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

<400> 18

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Xaa Asn Leu Ala
1 5 10

25

<210> 19

<211> 125

30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 19

40

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn
20 25 30

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

Val Ala Val Ile Ser Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

ES 2 731 757 T3

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Phe Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Tyr Phe
100 105 110

Thr Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 20

5 <211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <400> 20

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn
20 25 30

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

Val Ala Ala Ile Ser Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Phe Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Tyr Phe
100 105 110

Thr Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 21

20

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

5 <223> Polipéptido sintético

<400> 21

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn
20 25 30

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

Val Ala Gly Ile Ser Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Phe Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Tyr Phe
100 105 110

Thr Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

10

<210> 22

<211> 125

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> Polipéptido sintético

<400> 22

ES 2 731 757 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn
20 25 30

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

Val Ala Val Ile Ser Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Phe Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Tyr Phe
100 105 110

Thr Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 23

5 <211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <400> 23

ES 2 731 757 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn
20 25 30

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

Ala Ala Val Ile Ser Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Phe Cys Ala Arg Phe Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Tyr Phe
100 105 110

Thr Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 24

5 <211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <400> 24

ES 2 731 757 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn
 20 25 30
 Tyr Trp Ile Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ala Ala Val Ile Ser Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr
 50 55 60
 Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Phe Cys Ala Arg Phe Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Tyr Phe
 100 105 110
 Thr Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 25

5 <211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <400> 25

ES 2 731 757 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn
20 25 30

Tyr Trp Ile Cys Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ala Ala Cys Ile Ser Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Phe Cys Ala Arg Phe Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Tyr Phe
100 105 110

Thr Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

5 <210> 26

<211> 125

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Polipéptido sintético

<220>

<221> variante

20

<222> (2)..(2)

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

25 <400> 26

ES 2 731 757 T3

Gln Xaa Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn
 20 25 30
 Tyr Trp Ile Ala Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ala Ala Val Ile Ser Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr
 50 55 60
 Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Phe Cys Ala Arg Phe Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Tyr Phe
 100 105 110
 Thr Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 27

5 <211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <220>

<221> variante

<222> (78)..(78)

20

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

<400> 27

ES 2 731 757 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn
20 25 30

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

Ala Ala Val Ile Ser Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Xaa Thr Thr
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Phe Cys Ala Arg Phe Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Tyr Phe
100 105 110

Thr Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 28

5 <211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <220>

<221> variante

<222> (2)..(2)

20

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

<220>

25 <221> variante

<222> (78)..(78)

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

30

<400> 28

ES 2 731 757 T3

Gln	Xaa	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Glu
1			5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Phe	Asp	Arg	Asn
		20					25					30			
Tyr	Trp	Ile	Ala	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp
	35					40					45				
Ala	Ala	Val	Ile	Ser	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Thr
	50				55					60					
Trp	Ala	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Ser	Ser	Xaa	Thr	Thr
65				70					75					80	
Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
			85					90					95		
Phe	Cys	Ala	Arg	Phe	Tyr	Ser	Gly	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Gly	Tyr	Phe
		100					105					110			
Thr	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
	115					120					125				

<210> 29

5 <211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <220>

<221> variante

<222> (2)..(2)

20

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

<220>

25 <221> variante

<222> (78)..(78)

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

30

<400> 29

ES 2 731 757 T3

Gln Xaa Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn
 20 25 30

Tyr Trp Ile Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ala Ala Val Ile Ser Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr
 50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Xaa Thr Thr
 65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Phe Cys Ala Arg Phe Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Tyr Phe
 100 105 110

Thr Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 30

5 <211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <220>

<221> variante

<222> (2)..(2)

20

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

<220>

25 <221> variante

<222> (78)..(78)

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

30

<400> 30

ES 2 731 757 T3

Gln Xaa Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn
20 25 30

Tyr Trp Ile Cys Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ala Ala Cys Ile Ser Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Xaa Thr Thr

65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Phe Cys Ala Arg Phe Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Tyr Phe
100 105 110

Thr Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 31

5 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <400> 31

Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn Tyr Trp Ile Ala
1 5 10

<210> 32

20

<211> 11

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 32

5

Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn Tyr Trp Ile Ser
1 5 10

<210> 33

10 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Polipéptido sintético

20 <220>

<221> variante

<222> (11)..(11)

25

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

<400> 33

Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn Tyr Trp Ile Xaa
1 5 10

30

<210> 34

<211> 18

35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 34

45

Val Ile Ser Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 35

50 <211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Polipéptido sintético

<400> 35

Ala Ile Ser Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
1 5 10 15

Lys Gly

10

<210> 36

<211> 18

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> Polipéptido sintético

<400> 36

Gly Ile Ser Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
1 5 10 15

25

Lys Gly

<210> 37

30 <211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Polipéptido sintético

40 <220>

<221> variante

<222> (1)..(1)

45

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

<400> 37

Xaa Ile Ser Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
1 5 10 15

50

Lys Gly

<210> 38

ES 2 731 757 T3

<211> 109

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido sintético

<400> 38

```

Ala Phe Glu Leu Thr Gln Thr Thr Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly
1          5          10          15

Gly Thr Val Thr Ile Phe Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Asn
20          25          30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35          40          45

Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50          55          60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Val Ser Ala Leu Glu Cys
65          70          75          80

Ala Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Tyr Tyr Ser Pro Asn
85          90          95

Asp Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Arg
100          105

```

15

<210> 39

<211> 109

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Polipéptido sintético

<400> 39

ES 2 731 757 T3

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Tyr Tyr Ser Pro Asn
85 90 95

Asp Asn Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 40

5 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <400> 40

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 41

20

<211> 7

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

30

<400> 41

Leu Ala Ser Tyr Leu Ala Ser
1 5

35 <210> 42

<211> 11

<212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 42

Gln	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Ser	Pro	Asn	Asp	Asn	Ala
1				5					10	

15 <210> 43

<211> 125

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Polipéptido sintético

<220>

<221> variante

30

<222> (2)..(2)

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

35 <220>

<221> variante

<222> (79)..(79)

40

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

<400> 43

Gln	Xaa	Ser	Leu	Glu	Glu	Ser	Gly	Gly	Asp	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	1	5	10	15
Ser	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Phe	Asp	Arg	Asn	20	25	30	
Tyr	Trp	Met	Cys	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Met	Gly	Leu	Glu	Trp	35	40	45	
Ala	Ala	Cys	Ile	Ala	Ala	Gly	Gly	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Thr	50	55	60	
Trp	Ala	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Ser	Ser	Thr	Xaa	Thr	65	70	75	80
Val	Thr	Leu	Gln	Met	Ala	Ser	Leu	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	85	90	95	
Phe	Cys	Ala	Arg	Phe	Tyr	Asn	Gly	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Gly	Tyr	Phe	100	105	110	
Thr	Leu	Trp	Gly	Pro	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	115	120	125				

<210> 44

5 <211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15

<220>

<221> variante

<222> (32)..(32)

20

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

<220>

25

<221> variante

<222> (56)..(56)

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

30

<220>

<221> variante

<222> (101)..(114)

5 <223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

<400> 44

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Xaa
          20          25          30

Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
          35          40          45

Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Xaa Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp
          50          55          60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65          70          75          80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
          85          90          95

Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
          100          105          110

Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120          125

```

10

<210> 45

<211> 11

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> Polipéptido sintético

<400> 45

25

```

Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn Tyr Trp Met Cys
1          5          10

```

<210> 46

<211> 18

30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5

<223> Polipéptido sintético

<400> 46

Cys	Ile	Ala	Ala	Gly	Gly	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Thr	Trp	Ala
1				5					10					15	

Lys Gly

10

<210> 47

<211> 14

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 47

25

Phe	Tyr	Asn	Gly	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Gly	Tyr	Phe	Thr	Leu
1				5					10				

<210> 48

30 <211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Polipéptido sintético

40 <400> 48

ES 2 731 757 T3

Ala	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10						15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Gln	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Asn	Asn
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Leu	Ala	Ser	Tyr	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Ser	Pro	Asn
				85					90					95	
Asp	Asn	Ala	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys			
			100					105							

<210> 49

5 <211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <400> 49

ES 2 731 757 T3

Ala Phe Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Tyr Tyr Ser Pro Asn
85 90 95

Asp Asn Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 50

5 <211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <400> 50

Ala Phe Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

ES 2 731 757 T3

Asp Arg Val Thr Ile Phe Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Tyr Tyr Ser Pro Asn
85 90 95

Asp Asn Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 51

5 <211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <400> 51

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn
20 25 30

Tyr Trp Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Ala Val Ile Ala Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Phe Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Tyr Phe
100 105 110

ES 2 731 757 T3

Thr Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 52

5

<211> 125

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

15

<400> 52

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn
20 25 30

Tyr Trp Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Val Ala Val Ile Ala Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Phe Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Tyr Phe
100 105 110

Thr Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

20 <210> 53

<211> 125

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Polipéptido sintético

<400> 53

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Glu
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn
20          25          30

Tyr Trp Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35          40          45

Ala Ala Val Ile Ala Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr
50          55          60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65          70          75          80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85          90          95

Phe Cys Ala Arg Phe Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Tyr Phe
100         105         110

Thr Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115         120         125

```

5 <210> 54

<211> 125

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Polipéptido sintético

<400> 54

ES 2 731 757 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn
20 25 30

Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ala Ala Val Ile Ala Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Phe Cys Ala Arg Phe Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Tyr Phe
100 105 110

Thr Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 55

5 <211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <400> 55

ES 2 731 757 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Glu
1			5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Phe	Asp	Arg	Asn
		20						25					30		
Tyr	Trp	Met	Cys	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp
		35					40					45			
Ala	Ala	Cys	Ile	Ala	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Thr
	50					55					60				
Trp	Ala	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr
65				70						75				80	
Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
			85					90						95	
Phe	Cys	Ala	Arg	Phe	Tyr	Ser	Gly	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Gly	Tyr	Phe
			100					105					110		
Thr	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
		115					120					125			

<210> 56

5 <211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <220>

<221> variante

<222> (2)..(2)

20

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

<400> 56

ES 2 731 757 T3

Gln	Xaa	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Glu	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Phe	Asp	Arg	Asn	20	25	30	
Tyr	Trp	Met	Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	35	40	45	
Ala	Ala	Val	Ile	Ala	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Thr	50	55	60	
Trp	Ala	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	65	70	75	80
Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	85	90	95	
Phe	Cys	Ala	Arg	Phe	Tyr	Ser	Gly	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Gly	Tyr	Phe	100	105	110	
Thr	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	115	120	125				

<210> 57

5 <211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <220>

<221> variante

<222> (78)..(78)

20

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

<400> 57

ES 2 731 757 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn
 20 25 30

Tyr Trp Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ala Ala Val Ile Ala Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr
 50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Xaa Thr Thr
 65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Phe Cys Ala Arg Phe Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Tyr Phe
 100 105 110

Thr Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 58

5 <211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <220>

<221> variante

<222> (2)..(2)

20

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

<220>

25 <221> variante

<222> (78)..(78)

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

30

<400> 58

ES 2 731 757 T3

Gln Xaa Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn
20 25 30

Tyr Trp Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ala Ala Val Ile Ala Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Xaa Thr Thr
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Phe Cys Ala Arg Phe Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Tyr Phe

100 105 110

Thr Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 59

5 <211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

$\langle 220 \rangle$

<223> Polipéptido sintético

15

$\langle 220 \rangle$

<221> variante

 $\langle 222 \rangle (2) \dots (2)$

20

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

$\langle 220 \rangle$

25

<221> variante

$\langle 222 \rangle$ (78)..(78)

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

30

<400> 59

ES 2 731 757 T3

Gln Xaa Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn
20 25 30

Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ala Ala Val Ile Ala Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Xaa Thr Thr
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Phe Cys Ala Arg Phe Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Tyr Phe
100 105 110

Thr Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 60

5

<211> 125

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

15

<220>

<221> variante

20 <222> (2)..(2)

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

<220>

25

<221> variante

<222> (78)..(78)

30 <223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

<400> 60

ES 2 731 757 T3

Gln Xaa Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn
20 25 30

Tyr Trp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ala Ala Cys Ile Ala Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr
50 55 60

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Xaa Thr Thr
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Phe Cys Ala Arg Phe Tyr Ser Gly Gly Gly Tyr Tyr Ala Gly Tyr Phe
100 105 110

Thr Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 61

5

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

15

<400> 61

Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn Tyr Trp Met Ala
1 5 10

20 <210> 62

<211> 11

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Polipéptido sintético

<400> 62

Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn Tyr Trp Met Ser
1 5 10

5

<210> 63

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Polipéptido sintético

<220>

20 <221> variante

<222> (11)..(11)

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

25

<400> 63

Gly Phe Ser Phe Asp Arg Asn Tyr Trp Met Xaa
1 5 10

30 <210> 64

<211> 18

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Polipéptido sintético

<400> 64

Val Ile Ala Ala Gly Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala
1 5 10 15

Lys Gly

45

<210> 65

<211> 18

50 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

5 <220>

<221> variante

<222> (1)..(1)

10

<223> Xaa puede ser un aminoácido que existe de manera natural

<400> 65

Xaa	Ile	Ala	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Thr	Trp	Ala
1				5					10					15	

15

Lys Gly

<210> 66

<211> 216

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 66

30

ES 2 731 757 T3

Ala Phe Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Gly Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Ser Tyr Tyr Ser Pro Asn
 85 90 95

Asp Asn Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 67

5 <211> 454

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <400> 67

ES 2 731 757 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	
1				5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Phe	Asp	Arg	Asn	
			20					25					30			
Tyr	Trp	Ile	Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	
		35					40					45				
Val	Ala	Ala	Ile	Ser	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Thr	
	50					55					60					
Trp	Ala	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	
65					70					75					80	
Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	
				85					90					95		
Tyr	Cys	Ala	Arg	Phe	Tyr	Ser	Gly	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Gly	Tyr	Phe	
			100					105					110			
Thr	Leu	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	
		115					120					125				
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	
	130					135					140					

ES 2 731 757 T3

Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	145	150	155	160
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	165	170	175	
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	180	185	190	
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	195	200	205	
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	210	215	220	
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	225	230	235	240
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	245	250	255	
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	260	265	270	
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	275	280	285	
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	290	295	300	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	305	310	315	320
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	325	330	335	
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	340	345	350	
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	355	360	365	
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	370	375	380	
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	385	390	395	400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450

<210> 68

5

<211> 20

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

15

<400> 68

Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys
20

20 <210> 69

<211> 19

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Polipéptido sintético

<400> 69

Met Asp Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

35

<210> 70

<211> 1422

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Polinucleótido sintético

<400> 70

10

```

atggacttcg gcctgtcctg ggtgttcctg gtgctgggag tgaagggcgt gcagtgccag      60

gtgcagctgg tggaaaccgg cggtagcgtg gtgcagcctg gcagatccct gagactgtcc      120
tgcgcgcgct ccggtctctc ctccgaccgg aactactgga tcgcctgggt ccgacaggcc      180
cctggcaagg gactggaatg ggtggccggc atctccgctg gcggctccgg caacacctac      240
tacgccacct gggccaaggg cgggttcacc atctccggg acaactccaa gaacaccttg      300
tacctgcaga tgaactccct gcgggcccag gacacgcgag tgtactactg cgcctgggtc      360
tacagcggcg gaggctacta cgcggctac ttccacctgt ggggccaggg caccctggtc      420
accgtgtcct ccgcctctac caaggcccc tccgtgttcc ctctggcccc ctccagcaag      480
tccacctctg gcggcacccg cgtctctggg tgctctgtca aggactactt ccccgaaacc      540
gtgacgggtg cgtggaactc aggcgccttg accagcggcg tgcacacctt cccggtgtc      600
ctacagtcc caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg      660
ggcaccacga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag      720
aaagttgagc ccaaactctg tgacaagact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa      780
ctcctggggg gaccgtcagt ctctctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc      840
tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc      900
aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag      960
gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg      1020
ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag      1080
aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca      1140
tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gctgtgtcaa aggtctctat      1200
cccagcgaca tcgcctgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc      1260
acgcctcccg tgttggaact cgacggctcc ttcttctct acagcaagct caccgtggac      1320
aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac      1380
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctcccggtt ga      1422

```

<210> 71

15 <211> 711

ES 2 731 757 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Polinucleótido sintético

10 <400> 71

```

atgaggggtcc ccgctcagct cctgggggtc cttctgctct ggctccctgg agccagatgt      60
gccttccagc tgacctcagtc cccagctcc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgacc      120
atcaactgtc aggcctccca gtccatcggc ggcaacctgg cctggtatca gcagaagccc      180

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacctg gcctcctacc tggccagcgg cgtgccctcc      240
agattctccg gctctggctc cggcacccag tttacctga ccgtgtccag cctgcagccc      300
gaggacttcg ccacctacta ctgccagtcc tctactact cccccaacga caacgccttc      360
ggccagggca ccaaggtgga aatcaagcgt acggtggctg caccatctgt cttcatcttc      420
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac      480
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtgata acgccctcca atcgggtaac      540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc      600
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat      660
cagggcctga gctcgcccg tcaaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta g      711

```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal neutralizante del virus JC aislado contra la proteína de la cápside VP1 del JCV (JCV-VP1), donde dicho anticuerpo monoclonal comprende:
 - 5 un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, una secuencia de aminoácidos de CDR2 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35, y una secuencia de aminoácidos de CDR3 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos
 - 10 de CDR1 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, una secuencia de aminoácidos de CDR2 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y una secuencia de aminoácidos de CDR3 que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde al menos una secuencia de aminoácidos de la región de
 - 15 marco del dominio variable de cadena pesada es al menos un 90 % idéntica a la al menos una secuencia de aminoácidos de la región de marco correspondiente de una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos
 - 20 de dominio variable de cadena pesada que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.
4. El anticuerpo de la reivindicación 3, donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos
 - 25 de dominio variable de cadena pesada que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.
5. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde al menos una secuencia de aminoácidos de la región de
 - 30 marco del dominio variable de cadena ligera es al menos un 90 % idéntica a la al menos una secuencia de aminoácidos de la región de marco correspondiente de una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.
6. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos
 - 35 de dominio variable de cadena ligera que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.
7. El anticuerpo de la reivindicación 6, donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos
 - 40 de dominio variable de cadena ligera que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.
8. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos
 - 45 de dominio variable de cadena pesada que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.
9. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el anticuerpo es un anticuerpo
 - 50 quimérico.
10. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el anticuerpo comprende una
 - 55 región Fc IgG1.
11. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso en un método para tratar
 - 60 a un sujeto que tiene uno o más signos o síntomas de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), o que tiene LMP.
12. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 11, donde el anticuerpo cruza la barrera
 - 65 hematoencefálica.
13. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 11 o 12, donde el tratamiento da lugar a una reducción
 - 70 en la carga viral, una puntuación EDSS mejorada, una puntuación de Karnofsky mejorada, un escáner IRM mejorado, o una mejora en cognición.
14. El anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 11-13, donde el sujeto se somete, o
 - 75 se ha sometido, a tratamiento de inmunoterapia.

15. El anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 11-14, donde el sujeto es inmunodeficiente.

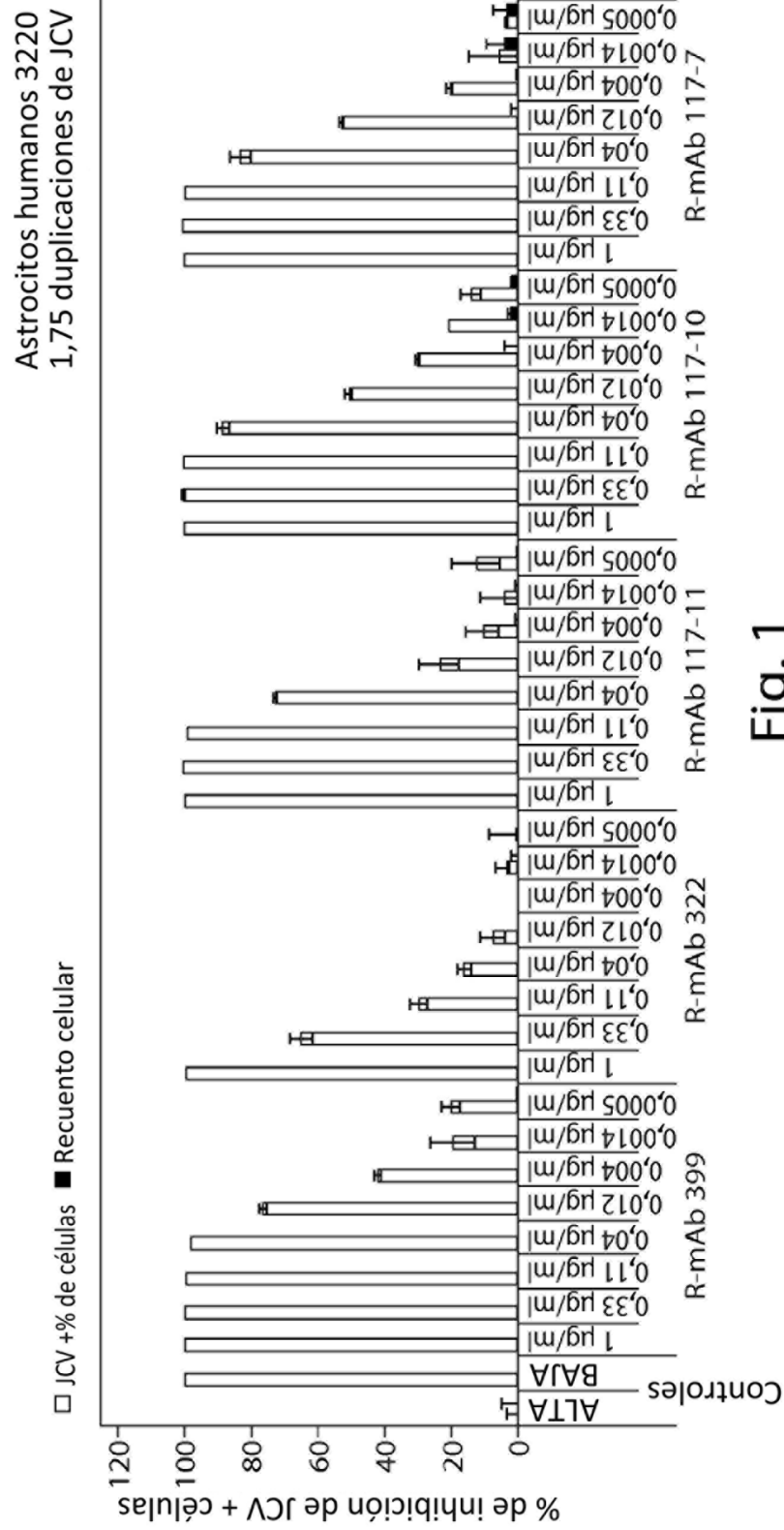


Fig. 1

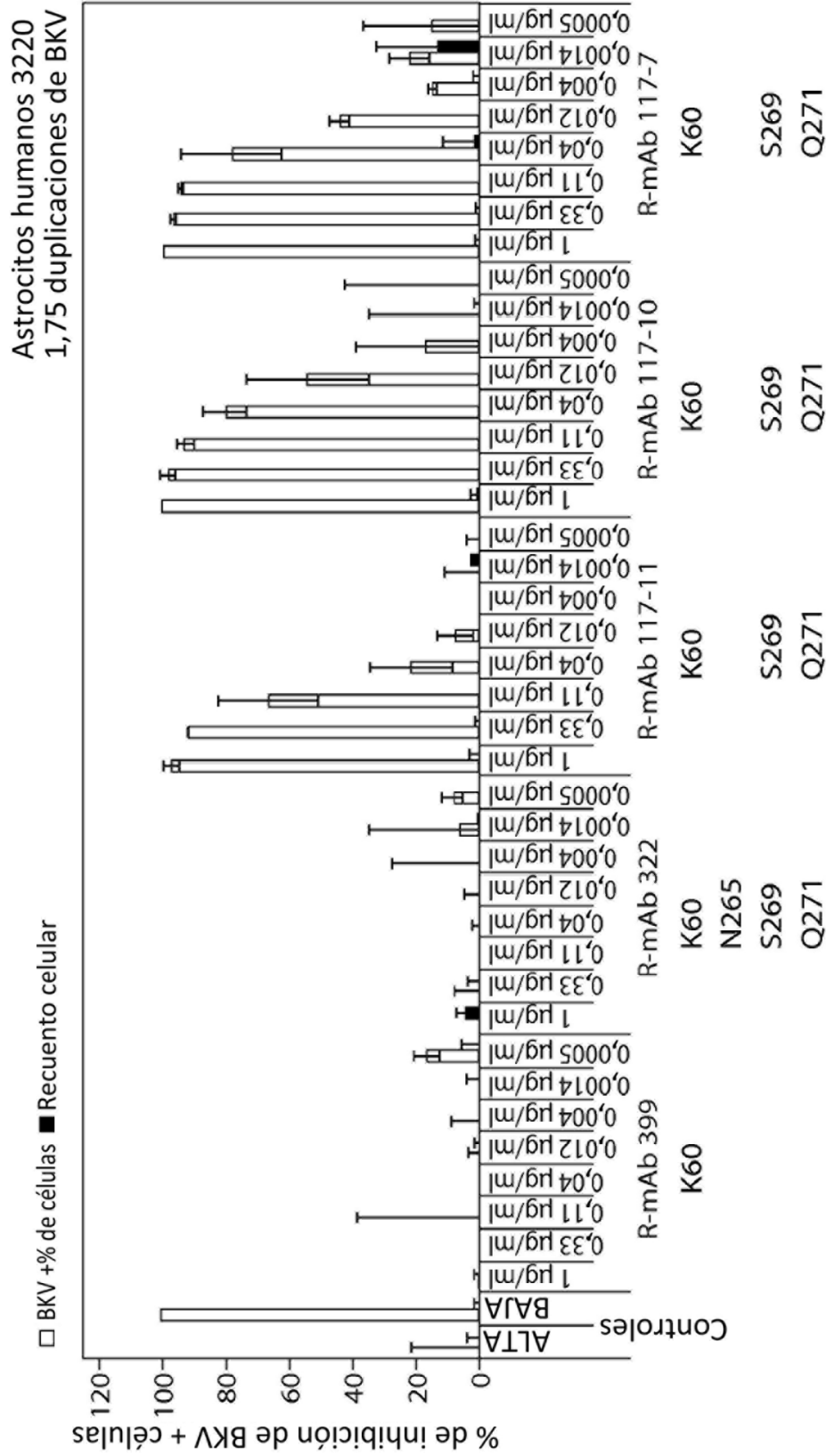
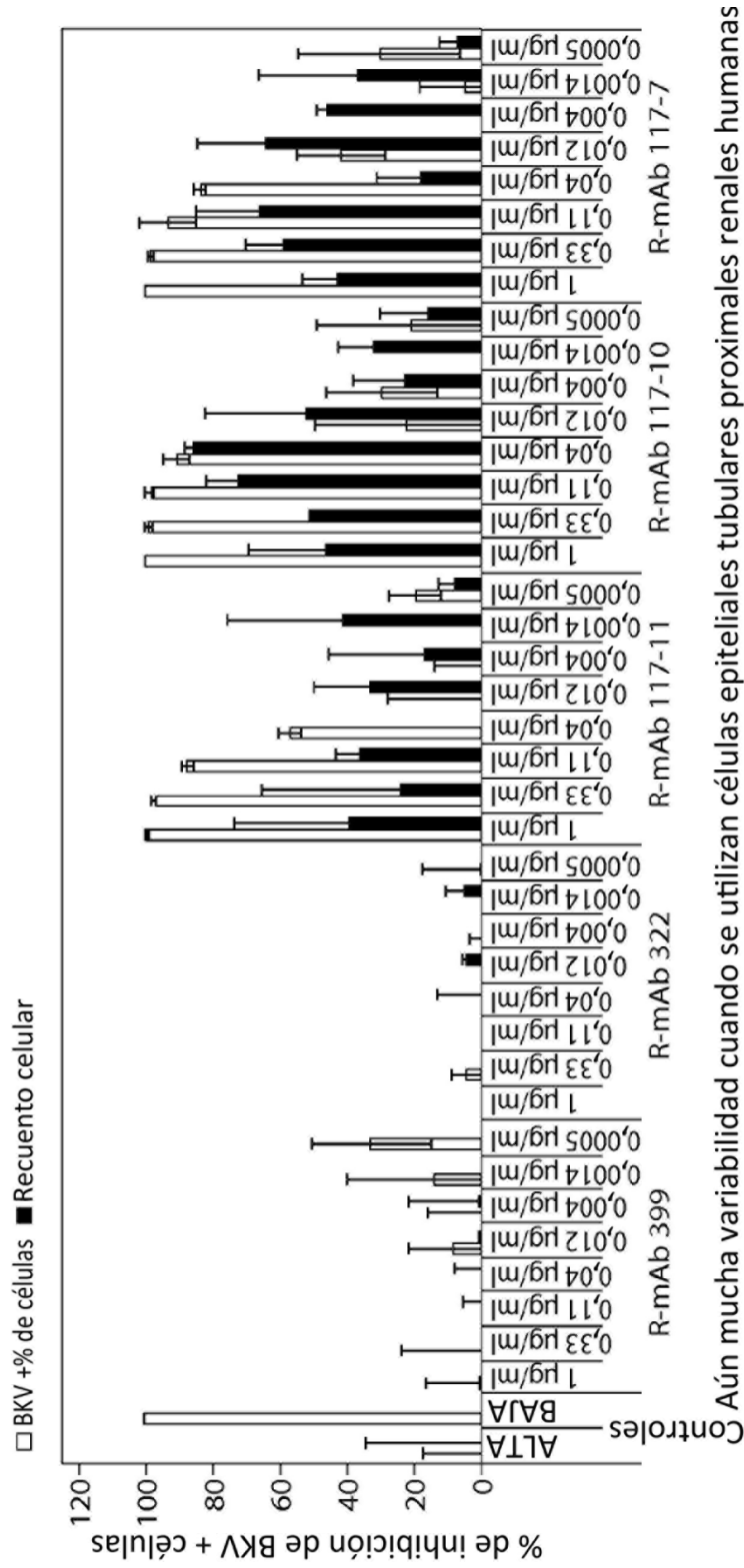


Fig. 1
continuación



Aún mucha variabilidad cuando se utilizan células epiteliales tubulares proximales renales humanas
La tendencia es la misma

mAb de conejo R117 neutraliza BKV
mAb de conejo R399 y R322 NO neutraliza BKV

Fig. 2

Cálculo de valores EC50, EC80 y EC90

	Anti-JCV			Anti-BKV		
	EC50	EC80	EC90	EC50	EC80	EC90
HA3220 1,75 d						
R-mAb 399	4,5	15,8	25,0	nc	nc	nc
R-mAb 322	185,8	2293,0	5710,0	0,1	0,7	0,3
R-mAb 117-11	21,6	46,9	66,8	77,7	151,3	392,2
R-mAb 117-10	8,3	34,7	57,2	12,6	26,9	48,3
R-mAb 117-7	11,2	32,5	57,9	13,4	40,5	63,3
HA3220 7,7 d						
R-mAb 399	4,3	15,3	29,0	nc	ambiguo	nc
R-mAb 322	162,3	9063,0	31320,0	nc	ambiguo	nc
R-mAb 117-11	20,0	50,5	75,8	41,9	122,4	244,6
R-mAb 117-10	10,0	29,5	46,6	14,4	37,6	111,6
R-mAb 117-7	9,0	31,5	59,1	7,9	70,2	106,1
HA3839 6,5 d						
R-mAb 399	4,9	15,9	28,0	nc	0,1	nc
R-mAb 322	193,7	5851,0	17510,0	interrumpido	0,0	ambiguo
R-mAb 117-11	22,5	51,1	82,5	21,0	81,3	128,2
R-mAb 117-10	10,0	31,3	51,4	7,9	67,4	178,6
R-mAb 117-7	10,7	41,6	86,7	9,2	102,2	199,1
HRPTEpiC5037 4,2 d						
R-mAb 399				nc	nc	nc
R-mAb 322				ambiguo	ambiguo	ambiguo
R-mAb 117-11				34,8	40,7	43,6
R-mAb 117-10				18,0	29,9	37,6
R-mAb 117-7				15,7	22,7	29,1

Valores dados en ng/ml

Fig. 3

Temperatura 25,8 471-WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	2,2892	2,429	1,5819	1,6797	2,4709	2,3032	2,2426	2,3727	1,5185	1,6004	2,4339	2,1823
	2,4044	2,5007	1,5064	1,6541	2,4367	2,4273	2,291	2,4472	1,4488	1,6178	2,3942	2,3025
	2,4428	2,4966	1,6641	1,6534	2,4679	2,4787	2,4244	2,4891	1,6134	1,5778	2,4029	2,3824
	2,5554	2,5388	1,7362	1,7066	2,422	2,5484	2,5069	2,4848	1,6776	1,6496	2,3734	2,3629
	2,4881	0,0752	1,5151	2,0824	2,5729	1,7729	2,3737	0,0764	1,4514	1,9033	2,5371	1,5579
	2,422	0,0794	1,6759	0,1684	2,4737	1,827	2,3517	0,0727	1,6798	0,1563	2,4585	1,4216
	2,4336	0,0974	1,6938	0,202	2,556	2,055	2,4232	0,0981	1,7072	0,1898	2,5737	1,7531
	2,5564	0,1199	1,7725	0,2836	2,5282	0,1265	2,5348	0,1115	1,7486	0,2702	2,4489	0,0965
							7-12 duplicado a 1-6					
Temperatura 25,8 55F(485)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	2,136	2,3371	1,6006	1,6645	2,3839	2,2497	2,0329	2,3013	1,5227	1,6088	2,3428	2,0036
	2,2773	2,4044	1,5522	1,6856	2,3807	2,4274	2,1808	2,3303	1,4484	1,6099	2,2757	2,1863
	2,2517	2,3837	1,6366	1,5942	2,3144	2,2751	2,0641	2,2974	1,588	1,5276	2,2402	2,2193
	2,3629	2,3174	1,6802	1,7124	2,2698	2,221	2,1439	2,2058	1,5774	1,5858	2,2449	2,2922
	2,3098	0,0889	1,5231	1,8793	2,4926	1,7118	2,0858	0,0635	1,4516	1,538	2,3943	1,1469
	2,2546	0,0826	1,6325	0,1444	2,3028	1,4469	2,0376	0,0736	1,559	0,114	2,2889	1,0918
	2,2417	0,0871	1,5846	0,1598	2,4264	1,8343	2,1499	0,0802	1,6425	0,1541	2,4023	1,4388
	2,3749	0,1056	1,6511	0,2147	2,3852	0,0881	2,1554	0,0954	1,6176	0,2016	2,3258	0,0878

Fig. 4-1

Temperatura 25,8 269F(502)	1	1,0633	2	1,5141	3	1,3141	4	1,4211	5	1,9558	6	1,5392	7	1,1383	8	1,5109	9	1,2616	10	1,2606	11	1,9404	12	1,4129
	1	1,1792	2	1,5824	3	1,2433	4	1,3656	5	1,8309	6	1,8111	7	1,3245	8	1,7244	9	1,201	10	1,2306	11	1,9806	12	1,5174
	1	1,2653	2	1,7061	3	1,363	4	1,3637	5	1,7442	6	1,8063	7	1,4132	8	1,872	9	1,2011	10	1,2487	11	1,7526	12	1,7526
	1	1,3786	2	1,2438	3	1,378	4	1,3891	5	1,5538	6	1,7777	7	1,6565	8	1,4758	9	1,3187	10	1,2776	11	1,7974	12	1,4563
	1	1,2213	2	0,1124	3	1,1777	4	2,0515	5	2,067	6	1,7608	7	1,3167	8	0,0949	9	1,0533	10	1,6367	11	2,0339	12	1,4199
	1	1,0035	2	0,1024	3	1,3097	4	0,1788	5	1,5748	6	1,7445	7	1,1634	8	0,0938	9	1,1773	10	0,1683	11	1,7627	12	1,2401
	1	1,0627	2	0,1077	3	1,3127	4	0,1954	5	1,9981	6	2,0452	7	1,0775	8	0,097	9	1,3776	10	0,2	11	1,8693	12	1,5139
	1	1,3302	2	0,1352	3	1,2434	4	0,2557	5	1,5568	6	0,1207	7	1,1735	8	0,114	9	1,235	10	0,2549	11	1,4768	12	0,1059
	1	0,9157	2	1,1761	3	0,1876	4	0,1896	5	1,3498	6	1,0079	7	0,9002	8	1,0636	9	0,1703	10	0,1814	11	1,3466	12	0,9353
	1	1,1703	2	1,3751	3	0,1892	4	0,2088	5	1,4823	6	1,4817	7	1,1993	8	1,3674	9	0,183	10	0,211	11	1,4414	12	1,3513
	1	1,2471	2	1,5675	3	0,2113	4	0,2017	5	1,5288	6	1,5708	7	1,5014	8	1,654	9	0,2097	10	0,2006	11	1,3642	12	1,3083
	1	1,4808	2	1,2911	3	0,2154	4	0,2176	5	1,4563	6	1,5589	7	1,5193	8	1,4537	9	0,2083	10	0,1998	11	1,371	12	1,3059
	1	1,2829	2	0,0895	3	0,1922	4	1,0231	5	1,7398	6	0,9234	7	1,3643	8	0,079	9	0,1938	10	1,0019	11	1,6066	12	0,6786
Temperatura 25,8 271H	1	1,2248	2	0,0831	3	0,2143	4	0,098	5	1,4979	6	0,7621	7	1,2535	8	0,0799	9	0,212	10	0,1125	11	1,2999	12	0,5857
	1	1,2693	2	0,1021	3	0,2275	4	0,1223	5	1,692	6	1,0455	7	1,2723	8	0,0977	9	0,2322	10	0,118	11	1,5952	12	0,8588
	1	1,2659	2	0,135	3	0,3267	4	0,1497	5	1,4151	6	0,113	7	1,346	8	0,0922	9	0,3001	10	0,1514	11	1,3289	12	0,0965
	1	0,9157	2	1,1761	3	0,1876	4	0,1896	5	1,3498	6	1,0079	7	0,9002	8	1,0636	9	0,1703	10	0,1814	11	1,3466	12	0,9353

Fig. 4-2

Temperatura	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
25,8	0,1276	0,1377	1,2509	1,335	0,157	0,1521	0,1436	0,1407	1,279	1,3671	0,1614	0,1344
60E	0,1517	0,1478	1,2516	1,3671	0,1742	0,1602	0,1477	0,1582	1,211	1,3716	0,152	0,1466
	0,1589	0,1594	1,354	1,3329	0,1716	0,1729	0,1738	0,1821	1,3902	1,3254	0,1544	0,1541
	0,1565	0,1358	1,4077	1,4058	0,1601	0,1656	0,1689	0,1494	1,3819	1,4035	0,1833	0,1732
	0,1361	0,0721	1,2101	1,6783	0,1919	1,4302	0,1666	0,0717	1,2374	1,5498	0,1631	1,3068
	0,1403	0,0784	1,3744	0,1364	0,1684	1,3839	0,1458	0,1014	1,4149	0,1457	0,1523	1,2703
	0,1542	0,0816	1,4229	0,1692	0,1917	1,7859	0,1736	0,0915	1,4511	0,1833	0,1887	1,5773
	0,1881	0,1247	1,2828	0,2267	0,192	0,1052	0,1706	0,1046	1,2778	0,233	0,1739	0,1014
Temperatura	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
25,8	1,7012	1,8744	0,5707	0,593	2,0382	1,7535	1,653	1,9112	0,5351	0,5695	2,0589	1,7929
66H	1,8596	1,9894	0,5027	0,5599	2,0283	2,0751	1,7914	1,9836	0,4398	0,5112	2,0652	2,0415
	1,7923	2,055	0,5332	0,5391	2,0644	2,1011	1,9913	2,1002	0,4795	0,4981	2,0094	2,0652
	2,0046	1,8756	0,5679	0,558	1,9793	2,1373	2,1105	1,9221	0,5052	0,497	1,9492	2,0342
	1,8329	0,0766	0,493	1,2099	2,2414	0,9386	2,0464	0,0664	0,4816	0,9487	2,101	0,9172
	1,8452	0,0658	0,5734	0,082	2,058	0,9264	1,957	0,0757	0,5798	0,1013	2,033	0,8083
	1,8111	0,0915	0,6177	0,1056	2,3343	1,3325	2,0215	0,0971	0,6499	0,1054	2,213	1,146
	1,9717	0,1115	0,7052	0,1228	2,022	0,1283	1,9925	0,1102	0,7162	0,1286	2,066	0,1093

Fig. 4-3

Clones	Actividad de unión								duplicado
	clones	color	471-WT	L55F	S269F	Q271H	K60E	D66H	
411-1	411-6	497-1	497-9	399-1	399-9				
411-2	411-7	497-2	497-10	399-2	399-10				
411-3	411-8	497-3	497-11	399-3	399-11				
411-4	411-9	497-4	497-12	399-4	399-12				
411-5	tampón	497-5	417-5	399-5	417-1				
411-6	tampón	497-6	422-1	399-6	417-2				
411-7	tampón	497-7	422-2	399-7	417-3				
411-8	tampón	497-8	422-3	399-8	417-4				

Fig. 4-4

ELISA de afinidad de candidato

	CH-399	BIIB048	HO _{V50A} L2 _{N31A}	HO _{V50A} L2 _{N31G}
Mad-1	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1
Tipo 3	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1
Tipo 1B	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1
Tipo 2A	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1
269F-tipo 3	2,8	nb	0,17	≤0,1
269Y-tipo 3	4	nb	3,7	≤0,1
269F-tipo 1B	>66	nb	3,7	≤0,1
S267F	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1
N265D	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1
Q271H	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1
D66H	≤0,1	0,12	0,15	≤0,1
K60E	>>>66	nb	nb	nb
K60N	>>66	nb	nb	nb
L55F	≤0,1	≤0,1	≤0,1	≤0,1

Fig. 5

Datos de afinidad con Biacore

K _D (nM)	Tipo 1B wt		Tipo 2A* wt		MAD-1 wt		Tipo 3 wt		Tipo 3 S269F		Tipo 3 S269Y		Tipo 3 L55F	
	Fab	mAb	Fab	mAb	Fab	mAb	Fab	mAb	Fab	mAb	Fab	mAb	Fab	mAb
Quimérico			1,9	≤0,01	0,4	≤0,01	0,5	≤0,01						
H0/L0			12,6		50		50	≤0,01	n.b	n.b	n.b	n.b		
V50A/N31 A			21,1		8,9	0,9			41	0,04	20,7	0,57		

K _D (nM)	Tipo 3 D66H		Tipo 3 Q271H		Tipo 3 K60E		Tipo 3 N265D		Tipo 3 K60N		Tipo 3 S269F		Tipo 1B S269F	
	Fab	mAb	Fab	mAb	Fab	mAb	Fab	mAb	Fab	mAb	Fab	mAb	Fab	mAb
Quimérico	1,1													
H0/L0	3,7													
V50A/N31 A														

Fig. 6

Frecuencia de mutación combinado JCVVP1

52 Genbank, 19 Tysabri, 40 Italian VHI

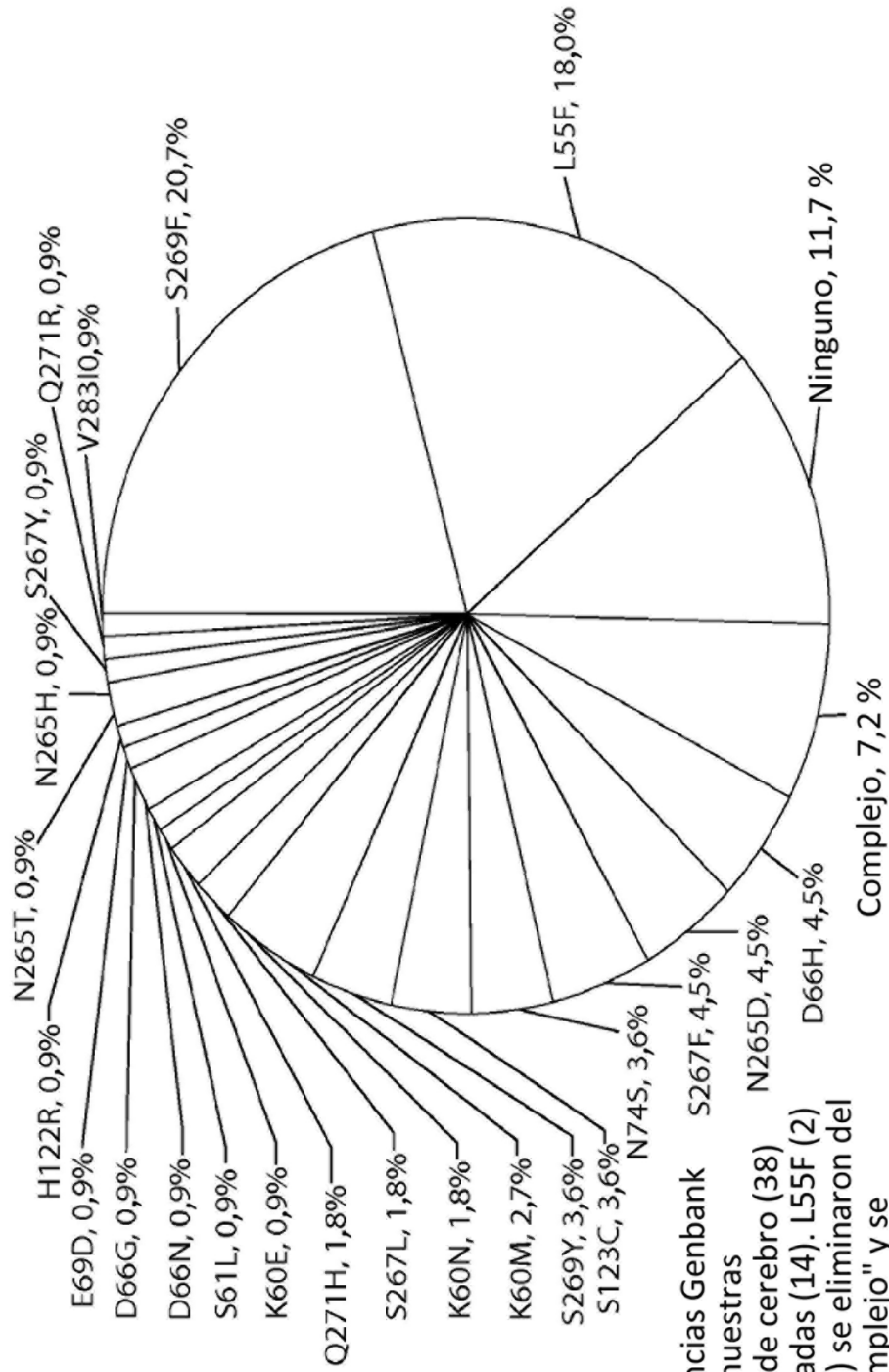
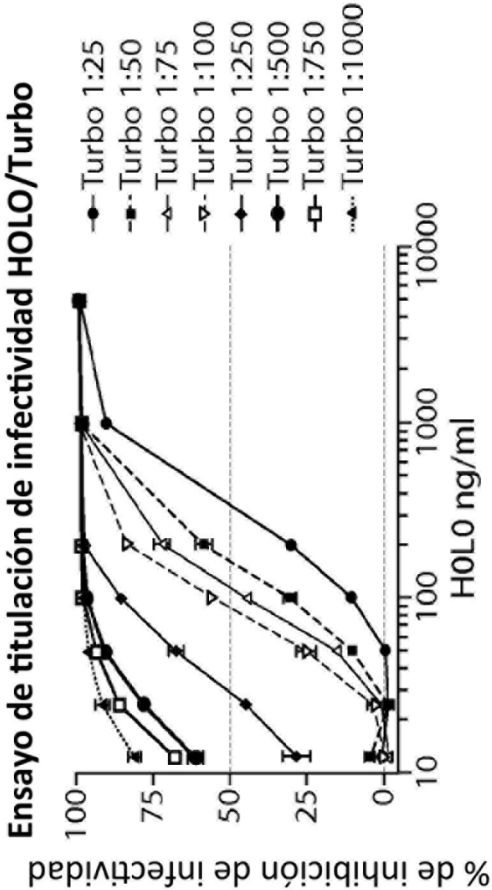


Fig. 7

Las secuencias Genbank incluyen muestras derivadas de cerebro (38) y no derivadas (14). L55F (2) y S269F (1) se eliminaron del grupo "complejo" y se incluyeron en su categoría apropiada

Ensayo de infectividad BIIB048 (HOL0)

Los valores de concentración inhibitoria dependen de los títulos de entrada de virus



Virus Dilución	IC50	IC90	Geq/ Well	Geq/ ml
25	301,5	898,4	1,02E+11	2,56E+12
50	160,5	537,5	5,11E+10	1,28E+12
75	109,4	368,3	3,41E+10	8,52E+11
100	83,21	259,5	2,56E+10	6,39E+11
250	39,07	138,9	1,02E+10	2,56E+11
500	19,14	61,57	5,11E+09	1,28E+11
750	8,713	33	3,41E+09	8,52E+10
1000	5,513	23,31	2,56E+09	6,39E+10

Fig. 8

Preparaciones de virus

- Purificaciones actuales:
 - Benzonasa/Neuraminidasa Tx de CM
 - Formado por un amortiguador de sacarosa al 40 %
 - Resuspendido: 0,01 x 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)
 - Todos se prepararon de material post-infección excepto ** que fueron post-transfección
 - Todos los títulos (Geq) se evaluaron mediante qPCR

Fig. 9

Infectividad del mutante viral: Ensayo de bloqueo de mAb

- Diseño:
 - Células 293ft: formato 96w, células 15e3/pocillo; placas recubiertas Fn a t = (-18 h)
 - 12 virus
 - Andamiaje 2A: wt, S269F, L55F, S269Y; K60E; K60M; S267F; N265D; Q271F; D66H; S61P
 - MAD1
 - 1,5e9GEq/well (MOI=1e5)
 - mAbs
 - B1B48, hu399 50-31G
 - Diluciones en serie 3 veces: 1000-0,46ng/ml concentración final
 - 2 réplicas de cada condición por placa; 1 virus x 3mAbs por placa
 - Preincubación virus + mAb 90 minutos a temperatura ambiente (volumen bajo, 35 ul)
 - Sobrepaso en presencia de mAb (a una concentración apropiada, fv 100 ul)
 - Aspirar medio y reemplazar con medio suplementado con mAb a 3dpi, 7dpi
 - Harvest @ 11dpi
 - aspirar medio, lavar PBS-PBS-Ca⁺⁺, lisar en 100 ul/pocillo modificado Tampón RIPA (Y.Gao)
- Lectura inicial:
 - Western (porción de 1 réplica para cada condición)
 - Todas las muestras 7,5 ul de lisado/pocillo
 - Detectar con PAB597 1 ug/ml O/N 4°C>> DαM-HRP 1 ::50K 90min » detectar reactivo ECL de Pierce SuperSignal West Dura

Fig. 10

Virus mutante - protección de mAb contra infección de 293ft:
2Awt, S269F, S269Y, L55F, K60E, K60M

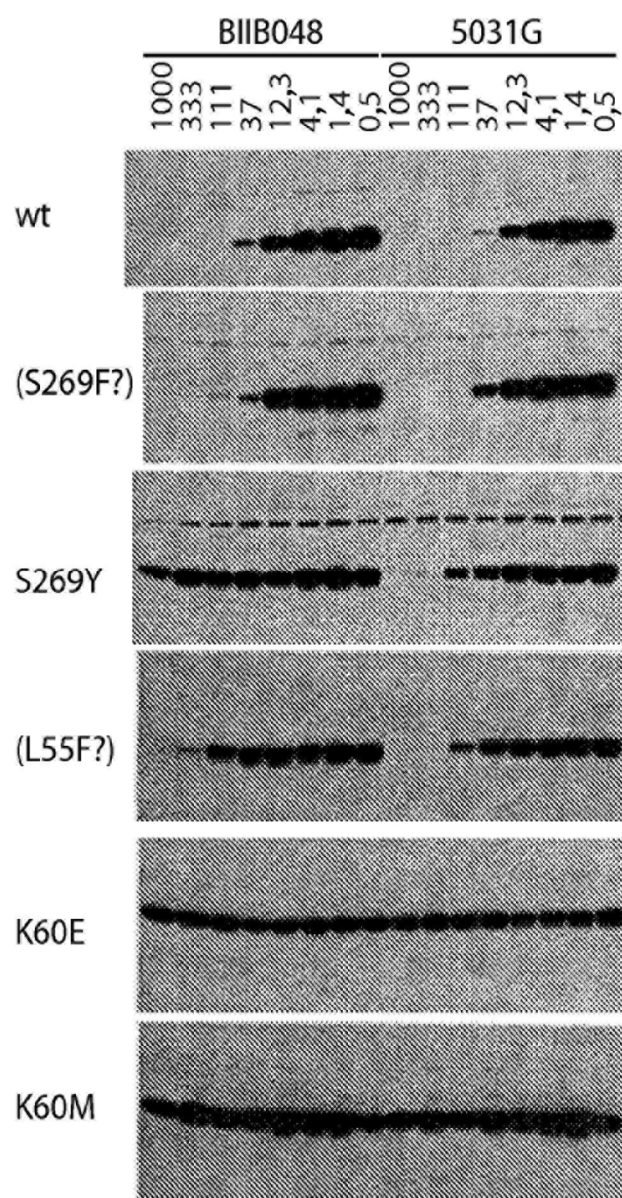


Fig. 11

Virus mutante - protección de mAb contra infección de 293ft
S61P, D66H, N265D, S267F, Q271H, MAD1wt

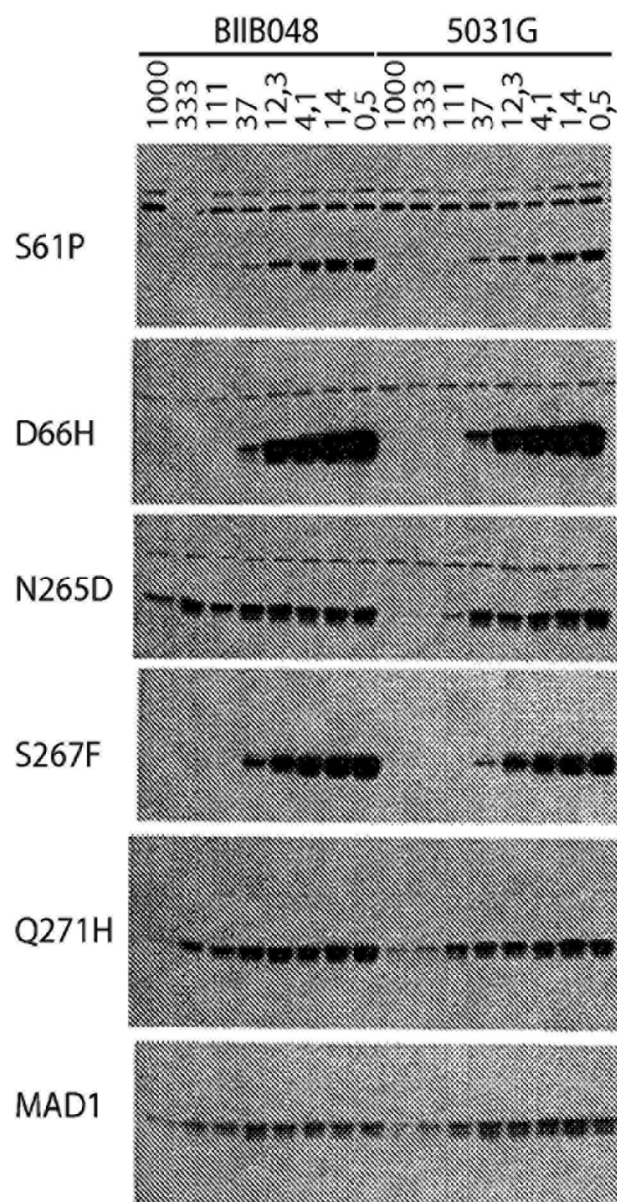


Fig. 12

**Virus mutante - protección de mAb BIIB048, H0L2
V50A/N31G frente a infección de VP1 mutante de 293ft**

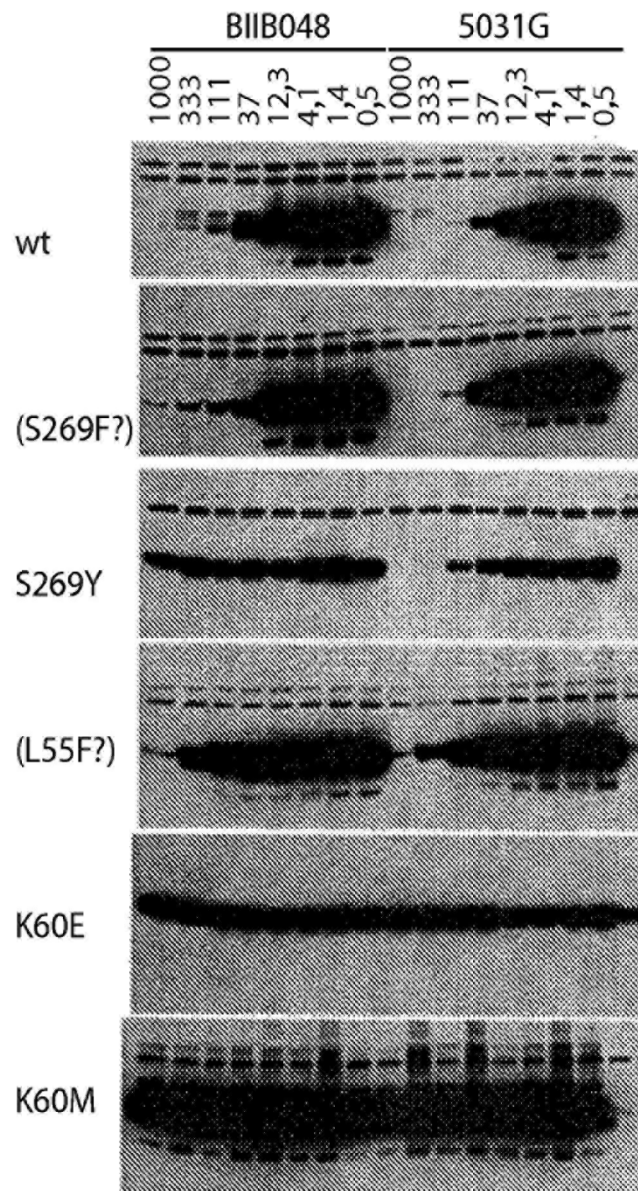


Fig. 13

**Virus mutante - protección de mAb contra infección de 293ft:
S61P, D66H, N265D, S267F, Q271H, MAD1wt**

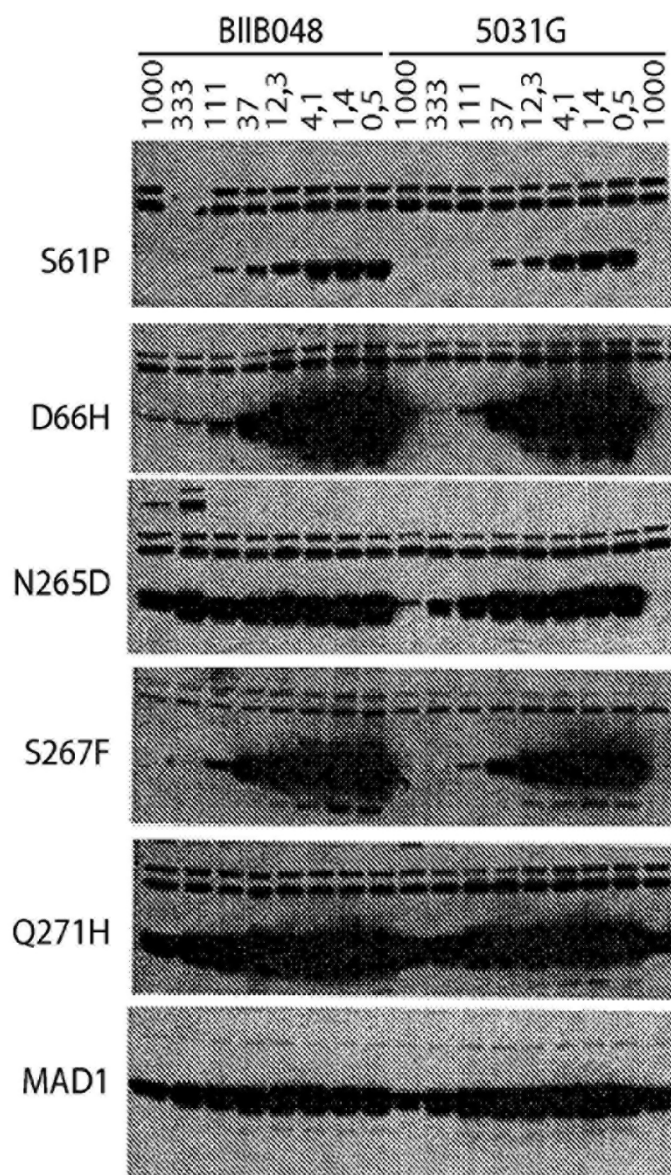


Fig. 14

ELISA de unión a VLP - Versión de robot



- Recubrir durante la noche a 42C con 0,2 ug/ml VLP diluido en D-PBS, 50 ul/pocillo
- 2 lavados con PBST
- Bloquear durante 1 h a temperatura ambiente con caseína BB
- 2 lavados con PBST
- 1 de reacción con diluciones 3 veces, placas duplicadas
- 5 lavados con PBST
- 1 h de reacción con Fc anti-HuIgG de cabra específico - F(ab')₂ - HRP(Jackson n.º 109- 036-098) 1:10k
- 5 lavados con PBST
- 4 minutos desarrollo de color con TMB
- Parar con 1N de H₂SO₄

Fig. 15

ELISA finales:
Seleccionar variantes de 399 en todas las VLP disponibles

- 399 descendientes: ch399
BIIB 048
5031G
- VLP's (todo se preparó con el método TFF/TMAE a menos que * indique el método 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 que empiezan a 2 ug/ml (12 puntos) placas de duplicados
- 10 o 20 placas por día, algunas VLP se duplicaron día a día para demostrar reproducibilidad

Fig. 16

ELISA EC₅₀, nM

	<u>ch399</u>	<u>BIIB048</u>	<u>5031G</u>	
WT (1A)	<0,1	<0,1	<0,1	
WT (1B)	<0,1	<0,1	<0,1	
WT (2A)	<0,1	<0,1	<0,1	
WT (2B)	<0,1	<0,1	<0,1	
WT (3)	<0,1	<0,1	<0,1	
WT (Mad-1)	<0,1	<0,1	<0,1	
L55F (1B)	<0,1	<0,1	<0,1	
L55F (3)	<0,1	0,12	0,12	
K60E (3)	>>10	nb	nb	
K60N (3)	>>10	nb	nb	
D66H (1B)	0,1	0,11	0,17	
D66H (3)	0,13	0,19	0,14	
N265D (1B)	<0,1	0,49	<0,1	
N265D (3)	<0,1	<0,1	<0,1	
S267F (1B)	0,96	nb	<0,1	
S267F (3)	<0,1	<0,1	<0,1	
S269F (1B)	>10	nb	<0,1	
S269F (3)	1,6	nb	<0,1	
S269Y (1B)	>>10	nb	1,6	
S269Y (3)	1,5	nb	<0,1	
Q271H (3)	<0,1	<0,1	<0,1	

Fig. 17