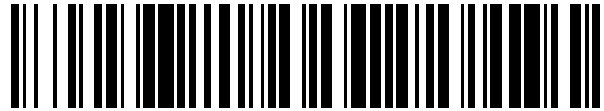


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 842 425**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.02.2010 PCT/US2010/000342**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.08.2010 WO10090757**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2010 E 10738871 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2020 EP 2394163**

54 Título: **Métodos para la detección del poliomavirus JC**

30 Prioridad:

05.02.2009 US 150310 P

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

14.07.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GORELIK, LEONID y
LUGOVSKOY, ALEXEY**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 842 425 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

Métodos para la detección del poliomavirus JC

Campo de la invención

5 La invención se refiere a métodos para la detección del virus poliomavirus JC humano, al diagnóstico de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) y al desarrollo de tratamientos para la LMP.

Antecedentes de la invención

10 La infección por poliomavirus JC (VJC) en los seres humanos puede causar una enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP). Sin embargo, la infección por VJC, por lo general, no produce LMP en sujetos sanos. La infección por VJC es prevalente en muchas poblaciones humanas sin causar LMP generalizada. La LMP típicamente se desarrolla solo en sujetos infectados por VJC que también tienen un sistema inmune debilitado. Los sujetos que están inmunocomprometidos debido a una enfermedad o a un tratamiento inmunosupresor pueden ser vulnerables a la LMP asociada con una infección por VJC.

Resumen de la invención

La invención se define por las reivindicaciones.

15 La invención se refiere a métodos para determinar si un sujeto es susceptible a LMP. En particular, la invención proporciona métodos para determinar si un sujeto presenta riesgo de desarrollar LMP si el sistema inmune del sujeto está comprometido o suprimido. Por ejemplo, los aspectos de la invención se refieren a determinar si un sujeto es adecuado para un tratamiento inicial o continuado con un agente inmunosupresor determinando el perfil de riesgo del sujeto para desarrollar LMP causada por una infección por VJC.

20 El genoma humano está expuesto a y puede adquirir muchos virus durante la vida de un individuo. Un ejemplo de dichos virus es el poliomavirus JC (VJC). La infección por el virus JC es altamente prevalente en los seres humanos. La infección primaria por VJC ocurre de forma asintomática durante la infancia (Padgett y Walker, 1973). A continuación, el VJC se disemina por todo el cuerpo, probablemente a través de la viremia (Ikegaya et al., 2004). Se cree que el VJC persiste principalmente en el tejido cerebral y renal. Aunque la infección por VJC es asintomática en la mayoría de los sujetos, la infección puede provocar afecciones graves (tales como la LMP) e incluso la muerte en algunos sujetos. Los sujetos más susceptibles a la LMP son sujetos inmunocomprometidos (p. ej., pacientes con SIDA) o sujetos que se están sometiendo a tratamiento con inmunosupresores (por ejemplo, después de un trasplante de órganos o para tratar una afección relacionada con la inflamación, tal como esclerosis múltiple). La presente invención proporciona variantes de VJC, identifica un panel de variantes que incluyen nuevas variantes que están asociadas con un mayor riesgo de LMP y métodos relacionados con el descubrimiento de conexiones estructurales y funcionales entre variantes de VJC y LMP.

30 Una secuencia de VJC de "tipo salvaje" se usa en la presente memoria para hacer referencia a la secuencia de cualquiera de los arquetipos de VJC que se encuentran en sujetos sanos que no tienen LMP y/o no presentan riesgo de LMP. En algunas realizaciones, una secuencia de referencia de "tipo salvaje" de consenso puede ser un promedio de secuencias encontradas en un grupo de individuos sanos. La discrepancia entre la alta prevalencia viral y la baja incidencia de LMP sugiere que, además de la disfunción inmune, podría haber algunas características virales únicas que regulen la progresión desde la infección asintomática a la LMP. En algunas realizaciones, los aspectos de la invención se refieren al descubrimiento de que la parte de la proteína de la superficie viral que es responsable de la interacción viral con los receptores celulares y la infección de la célula huésped adquiere mutaciones específicas de aminoácidos en el paciente en algún lugar en el camino desde el riñón, el sitio de infección asintomática, al SNC, el sitio de la LMP. Además, en algunas realizaciones, las mutaciones específicas de LMP cambian la capacidad de la cápside viral para unirse a varios ácidos siálicos y una variedad de tipos de células periféricas, pero retienen la capacidad de unirse a células gliales del SNC.

45 Tomando como base el análisis matemático de las secuencias de VP1 publicadas de pacientes con LMP y sin LMP, se proporciona una selección positiva de variantes de aminoácidos específicas durante la LMP. Sin embargo, dado que las secuencias de LMP disponibles públicamente se obtuvieron de LCR o tejidos cerebrales de pacientes con LMP, mientras que las secuencias no de LMP se obtuvieron de la orina de sujetos sanos, simplemente tomando como base el análisis de muestras de Genebank, no se pudo demostrar de manera inequívoca si estas variantes de aminoácidos se produjeron a través de una mutación viral en los pacientes o representaban una o más variantes virales raras que ocurren en todos los clados de VJC y están enriquecidas (p. ej., seleccionadas positivamente) en los casos de LMP por ser más propensas a causar LMP. Según aspectos de la invención, las sustituciones en VP1 ocurren dentro del paciente y pueden conducir a LMP. Esto está respaldado por el análisis de muestras de orina-LCR y orina-plasma concordantes del mismo paciente tomadas en el mismo punto de tiempo. Las secuencias de VP1 en plasma y LCR de pacientes con LMP contenían sustituciones de un solo aminoácido o deleciones de varios aminoácidos en relación con las secuencias de VP1 aisladas de la orina del mismo paciente. Como se muestra en la presente memoria, los tipos virales de JC encontrados en el LCR, el plasma y la orina del mismo individuo eran de la misma cepa viral, mientras que diferentes pacientes portaban diferentes cepas. Por tanto, pero sin pretender la vinculación a ninguna

teoría, la presencia de sustituciones de aminoácidos en VP1 en el LCR, pero no en la orina, es consecuencia de la aparición de una mutación en un paciente más que de una infección dual con dos variantes virales diferentes.

5 Algunas de las sustituciones de aminoácidos detectadas en el LCR y el plasma de pacientes con LMP se han descrito previamente. Sin embargo, estas sustituciones no se habían correlacionado directamente con un mayor riesgo de LMP y sus propiedades estructurales y funcionales no se habían asociado con aspectos del desarrollo y la progresión de la LMP. También se proporcionan en la presente memoria mutaciones y/o deleciones adicionales en VP1 de VJC asociadas con LMP.

10 Según aspectos de la invención, las sustituciones en la proteína VP1 pueden ser más importantes para determinar la progresión temprana de la enfermedad (p. ej., al permitir que el virus migre desde la periferia al SNC e infecte células del SNC) en lugar de determinar diferentes resultados en diferentes contextos clínicos. Sin embargo, en algunas realizaciones puede haber una asociación entre el tipo de mutación presente en VP1 y determinadas mediciones clínicas. Por ejemplo, se observaron niveles más bajos de replicación de VJC en LCR en pacientes con virus no mutados o virus que portaban mutaciones/deleciones en las posiciones 122-134. También es posible que, dado que las mutaciones afectan la fuerza de la interacción viral con los receptores celulares, la liberación viral de las células muertas también puede verse obstaculizada para un virus que se une estrechamente a esos receptores. Por consiguiente, se puede encontrar que un virus que tiene una avidez de unión celular más débil se libera en el espacio extracelular de manera más abundante. Esto es consistente con la observación de que los mutantes en las posiciones 15 55-61 y 265-271 pierden su capacidad para unirse a los receptores de ácido siálico en relación con el virus no mutado y, por lo tanto, podrían tener una mejor capacidad para desprenderse de los restos celulares (después de que el virus mata a la célula huésped) y encontrar su camino hacia el LCR.

20 Por consiguiente, aunque un sujeto puede estar infectado simultáneamente con varias versiones diferentes de VJC (p. ej., con diferentes variantes en diferentes tejidos u órganos), es más probable que las mutaciones asociadas a LMP surjan de una población de virus VJC existente en un individuo que está infectado con un VJC de tipo salvaje.

25 Los aspectos de la invención se basan, al menos en parte, en el descubrimiento de que determinados tipos de mutaciones en la proteína de la cápside de VJC están asociados con la conversión de una forma asintomática de infección por VJC en una forma de VJC asociada a LMP. Según los aspectos de la invención, sin comprometerse con ningún mecanismo en particular, las mutaciones que interrumpen la capacidad de una partícula de VJC para unirse a o interactuar con el ácido siálico pueden hacer que el virus ya no esté contenido en el compartimento periférico de un sujeto y dar como resultado que el virus obtenga vía libre al SNC, un sitio de la enfermedad de LMP. En algunas realizaciones, estas mutaciones permiten que el virus lo consiga evitando el "atrapamiento" en determinadas glicoproteínas y pseudorreceptores de glicolípidos expresados en órganos y células periféricos, que incluyen, pero no están limitados a, células inmunes y glóbulos rojos. Además, como algunos de estos sitios son dianas de la respuesta inmune normal del huésped (anticuerpos y células T), estas mutaciones pueden permitir que el virus evada el reconocimiento del sistema inmune, particularmente en sujetos con sistemas inmunes debilitados.

30 Los aspectos de la invención proporcionan métodos y composiciones para evaluar el perfil de riesgo de un sujeto para LMP.

35 En algunas realizaciones, los aspectos de la invención se refieren a determinar si un sujeto ha estado expuesto a una infección por cualquier variante de VJC. En algunos aspectos, la infección por una variante de VJC de tipo salvaje puede aumentar el perfil de riesgo para LMP, ya que las mutaciones asociadas a la LMP pueden surgir del VJC de tipo salvaje, aunque estos pueden ser eventos raros. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un sujeto puede ensayarse para determinar la presencia de uno o más indicios de infección por VJC (p. ej., detección de proteínas o ácido nucleico virales, o indirectamente mediante la detección de una respuesta inmune a una infección por VJC, p. ej., en la forma de anticuerpos séricos frente a proteínas virales de VJC). Debe apreciarse que se pueden evaluar indicios de la infección por cualquier VJC (p. ej., de tipo salvaje o variante). Si un sujeto ya ha estado expuesto a una infección por VJC, entonces se puede identificar que el sujeto tiene un perfil de riesgo más alto que un sujeto no infectado. Por consiguiente, un sujeto infectado por VJC que está siendo tratado con un agente inmunosupresor, puede ser evaluado para determinar mutaciones específicas de VJC o puede ser monitorizado con más frecuencia que un sujeto no infectado.

40 En algunas realizaciones, un sujeto que está siendo tratado con (o va a comenzar un tratamiento con) un agente inmunosupresor se ensaya para detectar uno o más indicios de infección por VJC. Si se detectan uno o más indicios de infección por VJC, se puede evaluar en el sujeto la presencia de una o más variantes de VJC asociadas con LMP como se describe en la presente memoria. Si no se detectan indicios de VJC, el sujeto puede ser monitorizado a lo largo del tiempo, p. ej., cada 4 semanas, mensualmente, cada tres meses, cada 4 meses, cada 6 meses o cada 12 meses, para detectar la presencia de cualquier indicio de infección por VJC. Si se detecta una infección por VJC, el sujeto puede ser evaluado adicionalmente para detectar la presencia de una o más variantes de VJC. Si se detecta una variante de VJC asociada con un mayor riesgo de LMP, el sujeto puede ser monitorizado adicionalmente para detectar cualquier signo temprano de LMP y/o el régimen de tratamiento puede alterarse como se describe con más detalle en la presente memoria.

En un aspecto, la invención proporciona un método que comprende examinar una muestra biológica de un sujeto para detectar al menos un indicio de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante que comprende una sustitución del residuo de aminoácido 122, y en donde se determina que el sujeto tiene una mayor susceptibilidad a la LMP si la muestra comprende al menos un indicio.

- 5 En un aspecto, la invención proporciona un método que comprende además examinar una muestra biológica de un sujeto para detectar al menos un indicio de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante que comprende una sustitución del residuo de aminoácido 2, y en donde se determina que el sujeto tiene una mayor susceptibilidad a la LMP si la muestra comprende al menos un indicio.

- 10 En un aspecto, la invención proporciona un método que comprende además examinar una muestra biológica de un sujeto para detectar al menos un indicio de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante que comprende una sustitución del residuo de aminoácido 66, y en donde se determina que el sujeto tiene una mayor susceptibilidad a la LMP si la muestra comprende al menos un indicio.

- 15 En un aspecto, la invención proporciona un método que comprende además examinar una muestra biológica de un sujeto para detectar al menos un indicio de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante que comprende una sustitución del residuo de aminoácido 283, y en donde se determina que el sujeto tiene una mayor susceptibilidad a la LMP si la muestra comprende al menos un indicio.

- 20 En algunas realizaciones, el método comprende además examinar la muestra biológica para detectar al menos un indicio de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante que comprende una sustitución de al menos uno de los residuos de aminoácidos 2 y 66. En algunas realizaciones, la muestra se examina usando un ensayo capaz de detectar al menos un indicio de cada una de las proteínas de la cápside VP1 de VJC variantes que tienen una sustitución en el residuo de aminoácido 122 y uno de los residuos de aminoácido 2 y 66, y en donde se determina que el sujeto tienen una mayor susceptibilidad a la LMP si la muestra comprende al menos un indicio de al menos una de las proteínas de la cápside VP1 de VJC variantes.

- 25 En algunas realizaciones, el método comprende además examinar la muestra biológica para detectar al menos un indicio de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante que comprende una delección del fragmento de aminoácidos 50-51. En algunas realizaciones, el método comprende además examinar la muestra biológica para detectar al menos un indicio de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante que comprende una delección del fragmento de aminoácidos 54-55. En algunas realizaciones, el método comprende además examinar la muestra biológica para detectar al menos un indicio de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante que comprende una delección del fragmento de aminoácidos 123-125.

- 30 En algunas realizaciones, el método comprende además examinar la muestra biológica para detectar al menos un indicio de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante que comprende una delección de uno o más fragmentos de aminoácidos 50-51, 54-55 y 123-125. En algunas realizaciones, la muestra se examina usando un ensayo que también es capaz de detectar al menos un indicio de cada una de las proteínas de la cápside VP1 de VJC variantes que tienen una delección de al menos uno de los fragmentos de aminoácidos 50-51, 54-55 y 123-125, y en donde se determina que el sujeto tiene una mayor susceptibilidad a la LMP si la muestra comprende al menos un indicio de al menos una de las proteínas de la cápside VP1 de VJC variantes.

- 35 En algunas realizaciones, el método comprende además examinar la muestra biológica para detectar al menos un indicio de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante que se sospecha que tiene una unión baja al ácido siálico.

- 40 En algunas realizaciones, el método comprende además examinar la muestra biológica para detectar al menos un indicio de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante que comprende una sustitución de al menos uno de los residuos de aminoácidos 55, 60, 265, 267 y 269. En algunas realizaciones, la muestra se examina usando un ensayo capaz de detectar también al menos un indicio de cada una de las proteínas de la cápside VP1 de VJC variantes que tienen una sustitución de al menos uno de los residuos de aminoácidos 55, 60, 265, 267 y 269, y en donde se determina que el sujeto tiene una mayor susceptibilidad a la LMP si la muestra comprende al menos un indicio de al menos una de las proteínas de la cápside VP1 de VJC variantes.

- 45 En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra de sangre. En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra de LCR. En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra de orina.

- 50 En algunas realizaciones, se sabe que el sujeto ha sido previamente infectado con un VJC de tipo salvaje. En algunas realizaciones, se examina una nueva muestra biológica del sujeto para detectar al menos un indicio de al menos una proteína de la cápside VP1 de VJC variante al menos dos veces al año. En algunas realizaciones, se examina una nueva muestra biológica del sujeto para detectar al menos un indicio de al menos una proteína de la cápside VP1 de VJC variante al menos diariamente, semanalmente, mensualmente, bimestralmente, trimestralmente, dos veces al año, anualmente, cada dos años o cada cinco años o cualquier frecuencia intermedia.

- 55 En algunas realizaciones, la detección de al menos un (p. ej., 2, 3, 4, 5 o más) indicio de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante se usa para identificar el sujeto como inapropiado para un tratamiento inmunosupresor. En algunas realizaciones, la detección de al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco,

al menos seis, al menos siete, al menos 8, al menos 9, al menos 10 o más indicios de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante se usa para identificar al sujeto como inapropiado para un tratamiento inmunosupresor.

5 En algunas realizaciones, la detección de al menos un indicio de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante se usa para recomendar una modificación de un tratamiento inmunosupresor para el sujeto. En algunas realizaciones, la detección de al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos 8, al menos 9, al menos 10 o más indicios de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante se usa para recomendar una modificación de un tratamiento inmunosupresor para el sujeto.

En algunas realizaciones, la ausencia de indicios de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante se usa para identificar al sujeto como apropiado para un tratamiento inmunosupresor.

10 En algunas realizaciones, la ausencia de indicios de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante se usa para identificar al sujeto como apropiado para el tratamiento inmunosupresor continuado.

En algunas realizaciones, la muestra biológica se examina para determinar la presencia de un anticuerpo que es específico para una proteína de la cápside VP1 de VJC variante.

15 En algunas realizaciones, la muestra biológica se examina para determinar la presencia de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante.

En algunas realizaciones, la muestra biológica se examina para determinar la presencia de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside VP1 de VJC variante.

En algunas realizaciones, la muestra biológica se examina usando un análisis basado en ELISA.

20 Por consiguiente, en algunas realizaciones, los sujetos pueden cribarse para determinar si presentan riesgo de desarrollar LMP. En determinadas realizaciones, los sujetos pueden cribarse para detectar LMP en estadio temprano antes de que la enfermedad progrese a una afección clínica grave. Se puede ensayar un sujeto para determinar el riesgo de LMP o la LMP en estadio temprano examinando una muestra biológica obtenida del sujeto para detectar indicios de exposición a una variante de VJC asociada a LMP, por ejemplo, una variante de VJC que se predice que tiene una unión reducida al ácido siálico. La invención proporciona posiciones específicas en la proteína principal de la cápside del virus JC (VJC-VP1) que están asociadas con el riesgo de LMP y/o la progresión de la enfermedad LMP. 25 En algunas realizaciones, el perfil de riesgo de un sujeto para LMP se determina tomando como base el estado mutacional en una o más posiciones seleccionadas de la proteína VP1 de un virus JC al que ha estado expuesto el sujeto.

30 Los aspectos de la invención son útiles para detectar el riesgo de LMP o la progresión de la enfermedad en un estadio temprano en sujetos susceptibles, por ejemplo, en pacientes que están inmunocomprometidos y/o están siendo tratados con agentes inmunosupresores.

35 Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona métodos para determinar que un sujeto es susceptible a LMP. En algunas realizaciones, el método comprende determinar que un sujeto es susceptible a LMP si el sujeto alberga una variante de VJC que se sospecha que tiene propiedades de unión baja a ácido siálico (p. ej., avidéz o afinidad).

40 En algunas realizaciones, el método comprende determinar si un sujeto alberga una variante de VJC que se sospecha que tiene una unión baja al ácido siálico, e identificar al sujeto como susceptible a LMP si el sujeto alberga la variante de VJC. En algunas realizaciones, el método comprende ensayar a un sujeto para determinar la presencia de una variante de VJC que se sospecha que tiene una unión baja al ácido siálico e identificar al sujeto como susceptible a LMP si se detecta la presencia de una variante de VJC que se sospecha que tiene una unión baja al ácido siálico.

45 En un aspecto, la invención proporciona métodos para determinar que un sujeto es apropiado para un tratamiento inmunosupresor. En algunas realizaciones, un método comprende determinar que un sujeto es apropiado para un tratamiento inmunosupresor si el sujeto no alberga una variante de VJC que se sospecha que tiene una unión baja al ácido siálico. En algunas realizaciones, un método comprende determinar si un sujeto alberga una variante de VJC que se sospecha que tiene una unión baja al ácido siálico; e identificar al sujeto como apropiado para un tratamiento inmunosupresor si el sujeto no alberga la variante de VJC, o identificar al sujeto como inapropiado para un tratamiento inmunosupresor si el sujeto alberga la variante de VJC.

50 En un aspecto, la invención proporciona métodos para determinar que un sujeto es inapropiado para un tratamiento inmunosupresor. En algunas realizaciones, un método comprende determinar que un sujeto es inapropiado para un tratamiento inmunosupresor si el sujeto alberga una variante de VJC que se sospecha que tiene una unión baja al ácido siálico.

En algunas de las realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, la determinación comprende ensayar una muestra biológica del sujeto para detectar un indicio de la variante de VJC que se sospecha que tiene una unión baja al ácido siálico. En algunas de las realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria,

- una muestra biológica es una muestra de orina, una muestra de sangre, plasma, suero, frotis mucoso o una muestra de LCR. En algunas de las realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, el indicio es la presencia de un anticuerpo que puede unirse específicamente a una variante de VJC que se sospecha que tiene una unión baja al ácido siálico. En algunas de las realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria,
- 5 el indicio es la presencia de una secuencia de ácido nucleico asociada con una variante de polipéptido de VJC que se sospecha tiene una unión baja al ácido siálico, en donde la secuencia de ácido nucleico no está presente en un VJC de tipo salvaje.
- En algunas de las realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, el ensayo comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo de VJC y evaluar la muestra para detectar la presencia de una variante de VJC o una variante de péptido de VJC. En algunas de las realizaciones de los métodos proporcionados
- 10 en la presente memoria, el ensayo comprende poner en contacto la muestra biológica con un péptido de VJC y evaluar la muestra para detectar la presencia de un anticuerpo de VJC. En algunas de las realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, el ensayo comprende realizar una reacción de PCR en la muestra biológica y evaluar la muestra para detectar la presencia de una variante de ácido nucleico de VJC.
- 15 En algunas de las realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, el tratamiento inmunosupresor comprende administrar un fármaco inmunosupresor. En algunas de las realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, el tratamiento inmunosupresor comprende la administración de un anticuerpo anti-VLA4. En algunas de las realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, el fármaco inmunosupresor es natalizumab.
- 20 En algunas de las realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, la variante de VJC que se sospecha que tiene una unión baja al ácido siálico es una variante de VJC que comprende una o más mutaciones en el sitio de unión al ácido siálico de VJC. En algunas de las realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, la mutación en el sitio de unión al ácido siálico de VJC es L55F, K60M, K60E, K60N, N265D, N265T, S267F, S267L, S269F, S269Y o S269C.
- 25 En algunas de las realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, la unión baja al ácido siálico de la variante de VJC es menor que la unión siálica de VJC WT.
- En algunas de las realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, el sujeto necesita tratamiento con un fármaco inmunosupresor o el sujeto está siendo tratado con un fármaco inmunosupresor.
- 30 También se describe un método que comprende obtener una muestra biológica de un sujeto, ensayar la muestra biológica para detectar un indicio de una variante de VJC que se sospecha que tiene una unión baja al ácido siálico, en donde el sujeto es identificado como susceptible a LMP si la muestra biológica contiene un indicio de la variante VJC.
- También se describe un método que comprende obtener una muestra biológica de un sujeto, ensayar la muestra biológica para detectar un indicio de una variante de VJC que se sospecha que tiene una unión baja al ácido siálico,
- 35 en donde el sujeto se identifica bien como i) apropiado para un tratamiento inmunosupresor si la muestra biológica no contiene el indicio de la variante de VJC ii) inapropiado para un tratamiento inmunosupresor si la muestra biológica contiene el indicio de la variante de VJC.
- También se describe un método que comprende monitorizar a un sujeto que recibe un tratamiento inmunosupresor para detectar si alberga una variante de VJC que se sospecha que tiene una unión baja al ácido siálico.
- 40 También se describe un método que comprende monitorizar a un sujeto que recibe un tratamiento inmunosupresor para detectar un signo de exposición a VJC y, si se detecta el signo de exposición a VJC, monitorizar entonces al sujeto para detectar si alberga una variante de VJC que se sospecha que tiene una unión baja al ácido siálico.
- La monitorización comprende obtener y ensayar periódicamente una muestra biológica del sujeto para detectar un indicio de la variante de VJC.
- 45 También se describe un método que comprende obtener una muestra biológica de un sujeto, ensayar la muestra biológica para detectar un indicio de VJC, en donde si la muestra biológica contiene un indicio de VJC, el sujeto se monitoriza periódicamente para detectar la presencia de una variante de VJC que se sospecha que tiene una unión baja al ácido siálico, y en donde si la muestra clínica no contiene VJC, el sujeto se monitoriza periódicamente para detectar una exposición a VJC.
- 50 También se describe un método para determinar si un régimen de tratamiento para administrar un agente inmunosupresor a un sujeto debe modificarse, método que comprende obtener una muestra biológica de un sujeto, ensayar la muestra biológica para detectar un indicio de una variante de VJC que se sospecha que tiene una unión baja al ácido siálico, en donde el régimen de tratamiento debe modificarse para el sujeto si la muestra biológica tiene el indicio de la variante de VJC.

El régimen de tratamiento debe modificarse administrando una dosis menor del agente inmunosupresor, reemplazando el agente inmunosupresor con un agente inmunosupresor diferente, o deteniendo la administración del agente inmunosupresor.

5 También se describe un método que comprende administrar un primer fármaco inmunosupresor a un sujeto y monitorizar si el sujeto alberga una variante de VJC que se sospecha que tiene una unión baja al ácido siálico. En algunas de las realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, la dosificación y/o la frecuencia de la administración del primer fármaco inmunosupresor se reduce si el sujeto alberga la variante de VJC. En algunas de las realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, el primer fármaco inmunosupresor se reemplaza por un segundo fármaco inmunosupresor si el sujeto alberga la variante de VJC. En algunas de las realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, el sujeto se criba para detectar un síntoma de LMP si el sujeto alberga la variante de VJC. En algunas de las realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, el sujeto se trata para LMP si el sujeto alberga la variante de VJC.

15 También se describe un método para detectar una variante de VJC que se sospecha que tiene una unión baja al ácido siálico, método que comprende examinar una muestra biológica de un sujeto usando un ensayo de alta sensibilidad específico para el indicio de una variante de VJC que se sospecha que tiene una unión baja al ácido siálico. En algunas de las realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, el examen comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo que puede unirse específicamente a la variante de VJC. En algunas de las realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, el examen comprende poner en contacto la muestra biológica con un polipéptido variante de VJC.

20 En algunas de las realizaciones de los métodos proporcionados en la presente memoria, el examen comprende poner en contacto la muestra biológica con un ácido nucleico variante de VJC.

Los aspectos de la invención incluyen paneles de posiciones de aminoácidos de VJC-VP1 en las que las variaciones de secuencia están asociadas con el riesgo de LMP y/o la progresión de la enfermedad. Se proporcionan métodos y composiciones para cribar sujetos para identificar individuos que han estado expuestos a un virus JC variante que tiene variaciones de secuencia asociadas a LMP en una o más de las posiciones de aminoácidos de VP-1 en un panel.

25 Los aspectos de la invención se pueden usar para diagnosticar LMP, o para evaluar y/o monitorizar la progresión, regresión y/o estado de la enfermedad LMP en un sujeto.

Determinados aspectos se refieren a la evaluación de tratamientos terapéuticos para la LMP.

Otros aspectos se refieren a vacunas frente a variantes del virus JC asociadas a LMP.

30 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus* JC variante. En algunas realizaciones, el ensayo examina al menos una posición de VJC-VP1 seleccionada de las posiciones 69, 74, 75, 113, 117, 128, 134, 158, 164, 223, 271, 321, 332 y 345 en la Tabla 1A para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que presenta riesgo de, o que tiene, LMP si está presente una variación de secuencia en una o más de las posiciones examinadas.

35 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus* JC variante. En algunas realizaciones, el ensayo examina una posición para detectar la presencia de una variación de secuencia. En algunas realizaciones, la posición es la posición 164. En algunas realizaciones, el sujeto se identifica como que presenta riesgo de, o que tiene, LMP si está presente una variación de secuencia en la posición 164.

40 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus* JC variante, en donde el ensayo examina al menos ocho posiciones de VJC-VP1 seleccionadas de las posiciones en la Tabla 1A para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que presenta riesgo de, o que tiene, LMP si está presente una variación de secuencia en una o más de las posiciones examinadas.

45 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus* JC variante, en donde el ensayo examina al menos ocho posiciones de VJC-VP1 seleccionadas de las posiciones en la Tabla 1A para detectar la presencia de una variación de secuencia, en donde una variación de secuencia es una de las siguientes 55F, 60M, 60E, 61L, 66H, 66N, 69D, 74S, 75R, 113L, 117S, 123C, 128A, 134G, 158L, 164K, 223A, 265D, 265T, 267F, 267L, 269F, 269Y, 271H, 321V, 332E o 345K, y en donde el sujeto se identifica como que presenta riesgo de, o que tiene, LMP si está presente una variación de secuencia en una o más de las posiciones examinadas.

ES 2 842 425 T3

En algunas realizaciones, se pueden examinar más de ocho posiciones de la Tabla 1A. En algunas realizaciones, se examinan 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 posiciones.

5 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina al menos cinco posiciones de VJC-VP1 seleccionadas de las posiciones en la Tabla 1B para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que presenta riesgo de, o que tiene, LMP si está presente una variación de secuencia en una o más de las posiciones examinadas.

10 En algunas realizaciones, se pueden examinar más de cinco posiciones de la Tabla 1B. En algunas realizaciones, se examinan seis o siete posiciones.

15 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina al menos cuatro posiciones de VJC-VP1 seleccionadas de las posiciones en la Tabla 1C para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que presenta riesgo de, o que tiene, LMP si está presente una variación de secuencia en una o más de las posiciones examinadas.

20 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina al menos dos posiciones de VJC-VP1 seleccionadas de las posiciones en la Tabla 1D para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que presenta riesgo de, o que tiene, LMP si está presente una variación de secuencia en una o más de las posiciones examinadas.

En algunas realizaciones, se pueden examinar más de dos posiciones de la Tabla 1D. En algunas realizaciones, se examinan 3, 4 o 5 posiciones.

25 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina al menos dos posiciones de VJC-VP1 seleccionadas de las posiciones en la Tabla 1F para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que presenta riesgo de, o que tiene, LMP si está presente una variación de secuencia en una o más de las posiciones examinadas.

30 En algunas realizaciones, se pueden examinar más de dos posiciones de la Tabla 1F. En algunas realizaciones, se examinan 3 o 4 posiciones.

35 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende: ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina al menos ocho posiciones de VJC-VP1 seleccionadas de las posiciones en la Tabla 1G para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que presenta riesgo de, o que tiene, LMP si está presente una variación de secuencia en una o más de las posiciones examinadas.

40 En algunas realizaciones, se pueden examinar más de ocho posiciones de la Tabla 1G. En algunas realizaciones, se examinan 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 posiciones.

45 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende: ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina al menos una posición de VJC-VP1 seleccionada de las posiciones en la Tabla 1H para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que presenta bajo riesgo de, o que no tiene, LMP si está presente una variación de secuencia en una o más de las posiciones examinadas. En algunas realizaciones, se examinan dos posiciones de la Tabla 1H.

50 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende: ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina al menos una posición de VJC-VP1 seleccionada de las posiciones en la Tabla 1H para detectar la presencia de una variación de secuencia, en donde una variación de secuencia es uno de los siguientes 115E o 277K, y en donde el sujeto se identifica como que presenta bajo riesgo de, o que no tiene, LMP si está presente una variación de secuencia en una o más de las posiciones examinadas.

55 En algunas realizaciones, se examinan dos posiciones de la Tabla 1H.

- 5 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina las posiciones en regiones seleccionadas de VJC-VP1 para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que presenta bajo riesgo de, o que no tiene, LMP si están presentes menos variaciones de secuencia que un número seleccionado en las posiciones examinadas.
- 10 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina al menos las posiciones 55-75 y 265-271 de VJC-VP1 para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que presenta bajo riesgo de, o que no tiene, LMP si están presentes menos de dos variaciones de secuencia en las posiciones examinadas.
- 15 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina al menos las posiciones 55-75, 113-164, 223, 265-277 y 321-345 de VJC-VP1 para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que presenta bajo riesgo de, o que no tiene, LMP si están presentes menos de tres variaciones de secuencia en las posiciones examinadas.
- 20 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina al menos las posiciones 55-75, 113-164, 223, 265-277 y 321-345 de VJC-VP1 para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que presenta bajo riesgo de, o que no tiene, LMP si están presentes menos de dos variaciones de secuencia en las posiciones examinadas.
- 25 En un aspecto, la invención proporciona un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina la posición 164 y al menos otra posición de VJC-VP1 seleccionada de las posiciones en la Tabla 1A para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que presenta riesgo de, o que tiene, LMP si está presente una variación de secuencia en una o más de las posiciones examinadas.
- 30 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina la posición 164 y al menos otra posición de VJC-VP1 seleccionada de las posiciones en la Tabla 1A para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que presenta riesgo de, o que tiene, LMP si está presente una variación de secuencia en dos o más de las posiciones examinadas.
- 35 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina posiciones en regiones seleccionadas de VJC-VP1 para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que presenta riesgo de, o que tiene, LMP si se ha incrementado el número de aminoácidos con una característica específica presente en las posiciones examinadas. En algunas realizaciones, la característica específica es la no polaridad.
- 40 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina al menos las posiciones 55-75 y 265-271 de VJC-VP1 para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que presenta riesgo de, o que tiene, LMP si se ha incrementado el número total de variantes de aminoácidos no polares (Gly, Ala, Val, Leu, Ile o Pro) o variantes aromáticas (Phe, Tyr o Trp) en las posiciones examinadas.
- 45 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina al menos las posiciones 55-75, 113-164, 223, 265-277 y 321-345 de VJC-VP1 para detectar la presencia de una variante, y en donde el sujeto se identifica como que presenta riesgo de, o que tiene, LMP si se ha incrementado el número total de variantes de aminoácidos no polares o variantes aromáticas en las posiciones examinadas.
- 50 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina al menos las posiciones 55-75 y 265-271 de VJC-VP1 para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que
- 55 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina al menos las posiciones 55-75 y 265-271 de VJC-VP1 para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que

presenta riesgo de, o que tiene, LMP si la una o más variaciones de secuencia en las posiciones examinadas dan como resultado un incremento en el área superficial no polar de 10 angstrom cuadrados o más por variación de secuencia.

5 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina posiciones en regiones seleccionadas de VJC-VP1 para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que presenta bajo riesgo de, o que no tiene, LMP si ha disminuido el número de aminoácidos con una característica específica presente en las posiciones examinadas. En algunas realizaciones, la característica específica es la polaridad.

10 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina al menos las posiciones 55-75 y 265-271 de VJC-VP1 para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que presenta riesgo de, o que tiene, LMP si ha disminuido el número total de número de variantes de aminoácidos polares (Ser, Thr, Cys, Met, Asn o Gln), variantes cargadas positivamente (Lys, Arg o His) o variantes cargadas negativamente (Asp o Glu) en las posiciones examinadas.

20 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina al menos las posiciones 55-75, 113-164, 223, 265-277 y 321-345 de VJC-VP1 para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que presenta riesgo de, o que tiene, LMP si ha disminuido el número total de variantes de aminoácidos polares, variantes cargadas positivamente o variantes cargadas negativamente en las posiciones examinadas.

25 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina al menos las posiciones 55-75 y 265-271 de VJC-VP1 para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que presenta riesgo de, o que tiene, LMP si la una o más de las variaciones de secuencia en las posiciones examinadas dan como resultado una disminución en el área superficial polar de 10 angstrom cuadrados o más por variación de secuencia.

30 También se describen métodos para examinar posiciones seleccionadas de VJC-VP1 para detectar variaciones de secuencia en una muestra biológica.

35 En algunas realizaciones, el examen de posiciones seleccionadas de VJC-VP1 para detectar variaciones de secuencia comprende determinar la presencia en una muestra biológica de uno o más anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos que comprenden una o más variaciones de la secuencia de aminoácidos seleccionadas del panel de la Tabla 1A o 1H. En algunas realizaciones, la presencia de uno o más anticuerpos se determina mediante la unión específica a polipéptidos producidos de forma recombinante que comprenden la una o más variaciones de secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, la presencia de uno o más anticuerpos se determina mediante la unión específica a polipéptidos producidos de forma sintética que comprenden la una o más variaciones de secuencia de aminoácidos.

40 En algunas realizaciones, el examen de posiciones seleccionadas de VJC-VP1 para detectar variaciones de secuencia comprende determinar la presencia en la muestra biológica de uno o más polipéptidos que comprenden la una o más variaciones de secuencia de aminoácidos seleccionadas del panel de la Tabla 1A o 1H. En algunas realizaciones, la presencia del uno o más polipéptidos se detecta mediante la unión específica de los polipéptidos a uno o más agentes de unión a péptidos. En algunas realizaciones, el agente de unión a péptidos es un anticuerpo.

45 En algunas realizaciones, el examen de posiciones seleccionadas de VJC-VP1 para detectar variaciones de secuencia comprende determinar la presencia en una muestra biológica de ácidos nucleicos que codifican la una o más variaciones de secuencia de aminoácidos seleccionadas del panel de la Tabla 1A o 1H.

50 En algunas realizaciones, el examen de posiciones seleccionadas de VJC-VP1 para detectar variaciones de secuencia se realiza en una muestra de sangre, líquido cefalorraquídeo, suero, orina, esputo, médula ósea, cerebro, bazo o riñón, u otro tejido.

En algunas realizaciones, el método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde la exposición al VJC variante comprende una infección actual con un VJC variante.

55 En algunas realizaciones, el método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de

exposición a un *poliomavirus JC* variante, la exposición al VJC variante comprende una infección previa, o el VJC variante no es detectable en la sangre u orina del sujeto.

- 5 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina al menos dos posiciones de VJC-VP1 seleccionadas de las posiciones en la Tabla 1F para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que presenta bajo riesgo de, o que no tiene, LMP si no está presente una variación de secuencia en una de las posiciones examinadas.
- 10 También se describe un método para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), método que comprende ensayar una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un *poliomavirus JC* variante, en donde el ensayo examina al menos dos posiciones de VJC-VP1 seleccionadas de las posiciones en la Tabla 1G para detectar la presencia de una variación de secuencia, y en donde el sujeto se identifica como que tiene bajo riesgo de, o que no tiene, LMP si no está presente una variación de secuencia en una de las posiciones examinadas.
- 15 También se describen kits para diagnosticar si un sujeto presenta riesgo de LMP.
- 20 En algunas realizaciones, el kit para diagnosticar si un sujeto presenta riesgo de LMP comprende uno o más contenedores, cada contenedor contiene un polipéptido que comprende una o más variaciones de la secuencia de aminoácidos seleccionadas del panel de la Tabla 1A, Tabla 17 y/o Tabla 18, y/o una o más de otras variantes descritas en la presente memoria, y el kit comprende además instrucciones para usar el polipéptido para determinar la presencia de anticuerpos que se unen específicamente a estos polipéptidos.
- 25 En algunas realizaciones, el kit para diagnosticar si un sujeto presenta riesgo de LMP comprende uno o más contenedores, cada contenedor contiene un polipéptido que comprende una o más variaciones de la secuencia de aminoácidos seleccionadas del panel de la Tabla 1B, y el kit comprende además instrucciones para usar el polipéptido para determinar la presencia de anticuerpos que se unen específicamente a estos polipéptidos.
- 30 En algunas realizaciones, el kit para diagnosticar si un sujeto presenta riesgo de LMP comprende uno o más contenedores, cada contenedor contiene un polipéptido que comprende una o más variaciones de la secuencia de aminoácidos seleccionadas del panel de la Tabla 1C, y el kit comprende además instrucciones para usar el polipéptido para determinar la presencia de anticuerpos que se unen específicamente a estos polipéptidos.
- 35 En algunas realizaciones, el kit para diagnosticar si un sujeto presenta riesgo de LMP comprende uno o más contenedores, cada contenedor contiene un polipéptido que comprende una o más variaciones de la secuencia de aminoácidos seleccionadas del panel de la Tabla 1D, y el kit comprende además instrucciones para usar el polipéptido para determinar la presencia de anticuerpos que se unen específicamente a estos polipéptidos.
- 40 En algunas realizaciones, el kit para diagnosticar si un sujeto presenta riesgo de LMP comprende uno o más contenedores, cada contenedor contiene un polipéptido que comprende una o más variaciones de la secuencia de aminoácidos seleccionadas del panel de la Tabla 1E, y el kit comprende además instrucciones para usar el polipéptido para determinar la presencia de anticuerpos que se unen específicamente a estos polipéptidos.
- 45 En algunas realizaciones, el kit para diagnosticar si un sujeto presenta riesgo de LMP comprende uno o más contenedores, cada contenedor contiene un polipéptido que comprende variaciones de la secuencia de aminoácidos en la posición 164, y el kit comprende además instrucciones para usar el polipéptido para determinar la presencia de anticuerpos que se unen específicamente a estos polipéptidos.
- 50 En un aspecto, la invención proporciona métodos para determinar el inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto.
- 55 En una realización del método para determinar el inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto, el método comprende determinar el número de variaciones de la secuencia de aminoácidos en la VJC-VP1 variante en una primera muestra biológica obtenida del sujeto, determinar el número de variaciones de la secuencia de aminoácidos en la VJC-VP1 variante en una segunda muestra biológica obtenida del sujeto en un momento posterior al que se obtuvo la primera muestra, comparar el número de variaciones de secuencia en la primera muestra con el número de

- 5 variaciones de secuencia en la segunda muestra, en donde un número menor de variaciones de secuencia en la primera muestra en comparación con el número de variaciones de secuencia en la segunda muestra indica el inicio o progresión de la LMP en el sujeto, y en donde un número mayor de variaciones de secuencia en la primera muestra en comparación con el número de variaciones de secuencia en la segunda muestra indica regresión de la LMP en el sujeto.
- En una realización del método para determinar el inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto, las variaciones de secuencia se seleccionan de las posiciones en la Tabla 1A.
- En una realización del método para determinar el inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto, las variaciones de secuencia se seleccionan de las posiciones en la Tabla 1B.
- 10 En una realización del método para determinar el inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto, las variaciones de secuencia se seleccionan de las posiciones en la Tabla 1C.
- En una realización del método para determinar el inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto, las variaciones de secuencia se seleccionan de las posiciones en la Tabla 1D.
- 15 En una realización del método para determinar el inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto, las variaciones de secuencia se seleccionan de las posiciones en la Tabla 1F.
- En una realización del método para determinar el inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto, las variaciones de secuencia se seleccionan de las posiciones en la Tabla 1G.
- En algunas realizaciones del método para determinar el inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto, las variaciones de secuencia se determinan comparando la VJC-VP1 variante con una VJC-VP1 de tipo salvaje.
- 20 En una realización del método para determinar el inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto, el método comprende determinar si está presente una variación de secuencia en la posición 164 en la VJC-VP1 variante en una primera muestra biológica obtenida del sujeto, determinar si está presente una variación de secuencia en la posición 164 en la VJC-VP1 variante en una segunda muestra biológica obtenida del sujeto en un momento posterior al que se obtuvo la primera muestra, en donde la ausencia de la variación de secuencia en la primera muestra y la presencia de la variación de secuencia en la segunda muestra indica el inicio o la progresión de la LMP en el sujeto, y en donde la presencia de la variación de secuencia en la primera muestra y la ausencia de la variación de secuencia en la segunda muestra indica la regresión de la LMP en el sujeto.
- 25 En algunas realizaciones del método para determinar el inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto, el método comprende además una monitorización adicional del inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto mediante la obtención de muestras adicionales del sujeto en puntos de tiempo posteriores, determinación del número de variaciones de la secuencia de aminoácidos en VJC-VP1 en estas muestras y comparación del número de variaciones de secuencia en estas muestras con el número de variaciones de secuencia en una o más muestras previas.
- 30 En algunas realizaciones del método para determinar el inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto, el sujeto se monitoriza mientras se somete a tratamiento con un inmunosupresor. En algunas realizaciones, el agente inmunosupresor es natalizumab.
- 35 En una realización del método para determinar el inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto, el método comprende determinar la carga viral de una VJC-VP1 variante en una primera muestra biológica obtenida del sujeto, determinar la carga viral de una VJC-VP1 variante en una segunda muestra biológica obtenida del sujeto en un momento posterior al que se obtuvo la primera muestra, comparar la carga viral en la primera muestra con la carga viral en la segunda muestra, en donde una carga viral más baja en la primera muestra en comparación con la carga viral en la segunda muestra indica el inicio o progresión de la LMP en el sujeto, y en donde una carga viral más alta en la primera muestra en comparación con la carga viral en la segunda muestra indica la regresión de la LMP en el sujeto.
- 40 En algunas realizaciones del método para determinar el inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto, el método comprende determinar la carga viral de una VJC-VP1 variante, la VJC-VP1 variante comprende una o más variaciones de secuencia seleccionadas de las posiciones en la Tabla 1A.
- 45 En algunas realizaciones del método para determinar el inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto, el método comprende determinar la carga viral de una VJC-VP1 variante, la VJC-VP1 variante comprende una o más variaciones de secuencia seleccionadas de las posiciones en la Tabla 1B.
- 50 En algunas realizaciones del método para determinar el inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto, el método comprende determinar la carga viral de una VJC-VP1 variante, la VJC-VP1 variante comprende una o más variaciones de secuencia seleccionadas de las posiciones en la Tabla 1C.

En algunas realizaciones del método para determinar el inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto, el método comprende determinar la carga viral de una VJC-VP1 variante, la VJC-VP1 variante comprende una o más variaciones de secuencia seleccionadas de las posiciones en la Tabla 1D.

5 En algunas realizaciones del método para determinar el inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto, el método comprende determinar la carga viral de una VJC-VP1 variante, la VJC-VP1 variante comprende una o más variaciones de secuencia seleccionadas de las posiciones en la Tabla 1F.

En algunas realizaciones del método para determinar la aparición, progresión o regresión de la LMP en un sujeto, el método comprende determinar la carga viral de una VJC-VP1 variante, la VJC-VP1 variante comprende una o más variaciones de secuencia seleccionadas de las posiciones en la Tabla 1G.

10 En algunas realizaciones del método para determinar el inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto, el método comprende determinar la carga viral de una VJC-VP1 variante, la VJC-VP1 variante comprende una variación de secuencia en la posición 164.

En algunas realizaciones del método para determinar el inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto, la carga viral de la VJC-VP1 variante se compara con la carga viral de una VJC-VP1 de tipo salvaje.

15 En algunas realizaciones del método para determinar el inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto, el método comprende determinar la carga viral de una VJC-VP1 variante, el método comprende además una monitorización adicional del inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto mediante la obtención de muestras adicionales del sujeto en puntos de tiempo posteriores, determinación de la carga viral de la VJC-VP1 variante en estas muestras y comparación de la carga viral en estas muestras con la carga viral en una o más muestras previas.

20 En algunas realizaciones del método para determinar el inicio, progresión o regresión de la LMP en un sujeto, el método comprende determinar la carga viral de una VJC-VP1 variante, se monitoriza al sujeto mientras se somete a tratamiento con un inmunosupresor. En algunas realizaciones, el agente inmunosupresor es natalizumab.

También se describen métodos para monitorizar la respuesta al tratamiento para la LMP en un sujeto.

25 En algunas realizaciones del método para monitorizar la respuesta al tratamiento de la LMP en un sujeto, el método comprende determinar el número de variaciones de la secuencia de aminoácidos en VJC-VP1 en una primera muestra biológica obtenida del sujeto, administrar el tratamiento de LMP al sujeto, determinar el número de variaciones de la secuencia de aminoácidos en VJC-VP1 en una segunda muestra, en donde la segunda muestra se obtiene del sujeto después del tratamiento y en un momento posterior a la primera muestra, y comparar el número de variaciones de la secuencia de aminoácidos en la primera muestra con el número de variaciones de la secuencia de aminoácidos en la segunda muestra, en donde un número menor de variaciones de la secuencia de aminoácidos en la segunda muestra que en la primera muestra indica que el sujeto responde al tratamiento de LMP.

30 En algunas realizaciones del método para monitorizar la respuesta al tratamiento de la LMP en un sujeto, el método comprende determinar la carga viral de una variante de VJC en una primera muestra biológica obtenida del sujeto, administrar el tratamiento para la LMP al sujeto, determinar la carga viral de una variante de VJC en una segunda muestra, en donde la segunda muestra se obtiene del sujeto después del tratamiento y en un momento posterior a la primera muestra, y comparar la carga viral en la primera muestra con la carga viral en la segunda muestra, en donde una carga viral más baja en la segunda muestra que en la primera muestra indica que el sujeto responde al tratamiento para la LMP.

35 También se describen métodos para seleccionar un curso de tratamiento de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene LMP.

40 En algunas realizaciones del método para seleccionar un curso de tratamiento de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene LMP, el método comprende determinar el número de variaciones de la secuencia de aminoácidos en VJC-VP1 en una muestra biológica obtenida del sujeto, comparar el número de variaciones de secuencia con un número de control de variaciones de secuencia, determinar el estadio de la LMP tomando como base, al menos en parte, la diferencia en el número de variaciones de secuencia en la muestra en comparación con el número de control de variaciones de secuencia, y seleccionar un curso de tratamiento para el sujeto apropiado para el estadio de la LMP del sujeto.

45 En algunas realizaciones del método para seleccionar un curso de tratamiento de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene LMP, el método comprende determinar la carga viral de una variante de VJC en una muestra biológica obtenida del sujeto, comparar la carga viral con la carga viral en una muestra de control, determinar el estadio de la LMP tomando como base, al menos en parte, la diferencia en la carga viral en la muestra en comparación con la muestra de control, y seleccionar un curso de tratamiento para el sujeto apropiado para el estadio de la LMP del sujeto.

50 También se describen métodos para decidir o ayudar en la decisión de interrumpir el tratamiento de un sujeto con uno o más inmunosupresores.

- 5 En algunas realizaciones del método para decidir o ayudar en la decisión de interrumpir el tratamiento de un sujeto con uno o más inmunosupresores, comprende determinar el número de variaciones de la secuencia de aminoácidos en VJC-VP1 en una muestra biológica obtenida del sujeto, comparar el número de variaciones de secuencia con un número de control de variaciones de secuencia, determinar una decisión para interrumpir el tratamiento de un sujeto con uno o más inmunosupresores tomando como base, al menos en parte, la diferencia en el número de variaciones de secuencia en la muestra en comparación con el número de control de variaciones de secuencia.
- 10 En algunas realizaciones del método para decidir o ayudar en la decisión de interrumpir el tratamiento de un sujeto con uno o más inmunosupresores comprende determinar la carga del vial de una variante de VJC en una muestra biológica obtenida del sujeto, comparar la carga viral con una carga viral en una muestra de control, determinar una decisión para interrumpir el tratamiento de un sujeto con uno o más inmunosupresores tomando como base, al menos en parte, la diferencia en la carga viral en la muestra en comparación con la muestra de control.
- En algunas realizaciones del método para decidir o ayudar en la decisión de interrumpir el tratamiento de un sujeto con uno o más inmunosupresores, el inmunosupresor es natalizumab.
- También se describen métodos para identificar compuestos terapéuticos candidatos.
- 15 En algunas realizaciones del método para identificar un compuesto terapéutico candidato, el método comprende poner en contacto un polipéptido aislado que comprende una o más variaciones de la secuencia de aminoácidos seleccionadas del panel de la Tabla 1A, Tabla 17 y/o Tabla 18, y/o una o más de las otras variantes descritas en la presente memoria, con un compuesto para determinar si el compuesto se une al polipéptido aislado, en donde si el compuesto se une al polipéptido aislado, el compuesto es un compuesto terapéutico candidato.
- 20 También se describen compuestos terapéuticos candidatos identificados al poner en contacto un polipéptido aislado que comprende una o más variaciones de la secuencia de aminoácidos seleccionadas del panel de la Tabla 1A, Tabla 17 y/o Tabla 18, y/o una o más de las otras variantes descritas en la presente memoria.
- 25 En algunas realizaciones del método para identificar un compuesto terapéutico candidato, el método comprende determinar un número de variaciones de la secuencia de aminoácidos en VJC-VP1 en una primera muestra biológica obtenida del sujeto, administrar un compuesto, determinar el número de variaciones de la secuencia de aminoácidos en VJC-VP1 en una segunda muestra biológica obtenida del sujeto en un momento posterior a la administración del compuesto, en donde si el número de variaciones de la secuencia de aminoácidos en VJC-VP1 en la segunda muestra es menor que en la primera muestra el compuesto es un compuesto terapéutico candidato.
- 30 También se describen compuestos terapéuticos candidatos identificados mediante la determinación de un número de variaciones de la secuencia de aminoácidos en VJC-VP1 en una primera muestra biológica obtenida del sujeto, la administración de un compuesto y la determinación del número variaciones de la secuencia de aminoácidos en VJC-VP1 en una segunda muestra biológica obtenida del sujeto en un momento posterior a la administración del compuesto.
- 35 En algunas realizaciones del método para identificar un compuesto terapéutico candidato, el método comprende determinar una carga viral de una variante de VJC en una primera muestra biológica obtenida del sujeto, administrar un compuesto, determinar la carga de una variante de VJC en una segunda muestra biológica obtenida del sujeto en un momento posterior a la administración del compuesto, en donde si la carga viral en la segunda muestra es menor que en la primera muestra, el compuesto es un compuesto terapéutico candidato.
- 40 También se describen compuestos terapéuticos candidatos identificados mediante la determinación de una carga viral de una variante de VJC en una primera muestra biológica obtenida del sujeto, la administración de un compuesto y la determinación de la carga viral de una variante de VJC en una segunda muestra biológica obtenida del sujeto en un momento posterior a la administración del compuesto.
- 45 También se describen vacunas que comprenden un polipéptido que tiene una variación de secuencia en una o más posiciones de VJC-VP1 seleccionadas de las posiciones en la Tabla 1A, Tabla 17 y/o Tabla 18, y/o una o más de las otras variantes descritas en la presente memoria. En algunas realizaciones, la vacuna comprende dos o más polipéptidos que tienen una variación de secuencia en una o más posiciones de VJC-VP1 seleccionadas de las posiciones de la Tabla 1A. En algunas realizaciones, las vacunas comprenden además un adyuvante.
- 50 También se describen métodos para inmunizar un sujeto frente a LMP, método que comprende administrar una vacuna que comprende uno o más polipéptidos que tienen una variación de secuencia en una o más posiciones de VJC-VP1 seleccionadas de las posiciones en la Tabla 1A, Tabla 17 y/o Tabla 18, y/o una o más de las otras variantes descritas en la presente memoria.
- 55 También se describe un anticuerpo aislado que se une específicamente a un polipéptido que tiene una variación de secuencia en una o más posiciones de VJC-VP1 seleccionadas de las posiciones en la Tabla 1A. En algunas realizaciones, el polipéptido tiene 2, 3, 4, 5 o más variaciones de secuencia en las posiciones de VJC-VP1 seleccionadas de las posiciones en la Tabla 1A, Tabla 17 y/o Tabla 18, y/o una o más de las otras variantes descritas en la presente memoria. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el agente es un anticuerpo policlonal.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a una partícula de VP1 que comprende al menos un polipéptido de VP1 que contiene una variación de secuencia descrita en la presente memoria. Una partícula de VP1 útil en la invención se puede producir usando métodos conocidos en la técnica, en general expresando un polipéptido de VP1 recombinante que comprende una variante descrita en la presente memoria. Una partícula de VP1 contiene al menos 2, 4, 10, 20, 30, 40 o 50 polipéptidos de VP1. En algunas realizaciones, la partícula de VP1 comprende solo polipéptidos de VP1 que contienen una variante. En otras realizaciones, la partícula de VP1 es una partícula heterogénea que contiene más de una secuencia polipeptídica de VP1; p. ej., más de un polipéptido variante o al menos un polipéptido variante y al menos un polipéptido de tipo salvaje.

También se describe una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica una variante del polipéptido VP1 (p. ej., que contiene una o más variantes descritas en las Tablas 1A-1H, Tabla 17 y/o Tabla 18 y/o una o más de las otras variantes descritas en la presente memoria) o un péptido de dicho polipéptido, el polipéptido o péptido incluye la región de unión al ácido siálico de un polipéptido de VP1. En algunos casos, la invención incluye dicha secuencia de ácido nucleico aislada unida operativamente a una secuencia de control de la expresión heteróloga. La invención también incluye vectores y células huésped, transfectadas de forma transitoria o estable que contienen dichas secuencias de ácido nucleico. Los métodos para producir dichas secuencias, vectores y células huésped se conocen en la técnica.

Cada una de las limitaciones de la invención puede englobar varias realizaciones de la invención. Por lo tanto, se anticipa que cada una de las limitaciones de la invención que implican cualquier elemento o combinaciones de elementos puede incluirse en cada aspecto de la invención. Esta invención no se limita en su aplicación a los detalles de construcción y a la disposición de los componentes mostrados en la siguiente descripción o ilustrados en las figuras. La invención permite otras realizaciones y ser llevada a la práctica o ser llevada a cabo de varias maneras. Además, la redacción y la terminología usadas en la presente memoria tienen fines descriptivos y no deberían ser interpretadas como limitantes. El uso de "que incluye", "que comprende" o "que tiene", "que contiene", "que implica", y variaciones de estos en la presente memoria, pretende englobar los ítems que se enumeran a continuación y sus equivalentes, así como ítems adicionales.

25 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra la comparación de una secuencia de VJC-VP1 de referencia con la secuencia de SV40 COA;

La FIG. 2 muestra un modelo de VJC-VP1;

La FIG. 3 muestra secuencias de péptidos de VP1;

La FIG. 4 muestra una distribución filogenética de virus asociados a LMP;

La FIG. 5 muestra un modelo estructural del complejo de VP1 de VJC/tetrasacárido NeuNAc-(α 2,3)-Gal-(β 1,3)-[(α 2,6)-NeuNAc]-Glc-NAc;

La FIG. 6 muestra la calidad de las partículas similares a virus;

La FIG. 7 muestra que VJC WT se une a algunos glicanos;

La FIG. 8 muestra la estructura de gangliósidos seleccionados y su capacidad para unirse a VJC WT;

La FIG. 9 muestra que las mutaciones F55 y F269 no son capaces de unirse a los glicanos Neu5Aca(2-3) y α (2-6);

La FIG. 10 muestra la estructura de gangliósidos seleccionados y su capacidad de unirse al VJC mutante;

La FIG. 11 compara la capacidad de VJC WT y mutante para unirse a gangliósidos seleccionados;

La FIG. 12 muestra que VJC mutante todavía es capaz de unirse a líneas de células gliales;

La FIG. 13 muestra que los anticuerpos específicos de VJC mutante pueden distinguirse de un anticuerpo de VJC WT;

La FIG. 14 muestra un ensayo para distinguir anticuerpos de mutantes de WT;

La FIG. 15 compara los anticuerpos de VJC mutante y VJC WT por su capacidad para unirse a una VJC-VLP mutante;

La FIG. 16 compara los anticuerpos de VJC mutante y VJC WT por su capacidad para unirse a una VJC-VLP mutante;

La FIG. 17 muestra que un paciente que tiene el virus mutante F269 ha desarrollado una respuesta de anticuerpos frente al virus WT pero no frente al virus mutante F269;

La FIG. 18 muestra que (en la parte superior) el conejo inmunizado con VLP no mutante genera anticuerpos frente al sitio (S269 en estos casos) que podría mutar;

La FIG. 19 muestra que se encontraron niveles más altos de ADN de VJC en LCR en pacientes con mutaciones de los bucles BC y HI que en aquellos con mutaciones del bucle DE o sin mutaciones;

La FIG. 20 muestra un modelo estructural del complejo de VP1 de VJC/tetrasacárido NeuNAc-(a2,3)-Gal-(b1,3)-[(a2,6)-NeuNAc]-Glc-NAc; y,

La FIG. 21 muestra que las mutaciones específicas de VP1 en LMP anulan o cambian drásticamente la especificidad de la proteína de la cápside viral VP1 por los gangliósidos sialilados.

5 Descripción detallada de la invención

Los aspectos de la invención se refieren a la identificación y la gestión de la asistencia sanitaria de los sujetos que presentan un mayor riesgo de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP). La LMP puede estar causada por una infección por poliomavirus JC (VJC) en los seres humanos, particularmente en sujetos que tienen un sistema inmune debilitado. Sin embargo, la LMP no se desarrolla en todos los sujetos infectados por VJC que tienen sistemas inmunes debilitados. Según la invención, solo determinadas variantes de VJC causan LMP. En algunas realizaciones, es particularmente probable que las variantes de VJC que tienen una unión reducida al ácido siálico causen LMP. Por consiguiente, los aspectos de la invención se refieren a métodos y composiciones para detectar la presencia de variantes de VJC que se predice que tienen una unión reducida al ácido siálico.

Según los aspectos de la invención, y sin pretender la vinculación a ninguna teoría, una variante de VJC que tiene una unión baja al ácido siálico, en relación con la unión siálica de un VJC de tipo salvaje, tiene unión reducida a sitios periféricos (p. ej., ácido siálico en células periféricas, proteínas, azúcares u otras moléculas). Por tanto, en algunas realizaciones, es más probable que estas variantes se diseminen a otras partes del cuerpo, por ejemplo, al SNC. Además, según aspectos de la invención, los sujetos con sistemas inmunes sanos controlan la diseminación de determinadas variantes de VJC con unión reducida al ácido siálico. Sin embargo, en sujetos con sistemas inmunes comprometidos, es más probable que estas variantes eludan el sistema inmune y progresen a LMP.

Por consiguiente, los aspectos de la invención se refieren a composiciones y métodos para detectar la presencia de variantes de VJC que se predice que tienen una unión baja al ácido siálico (p. ej., unión o avidéz baja) en relación con la unión de VJC normal o de tipo salvaje. En algunas realizaciones, se predice que las variantes de VJC con una o más mutaciones en el dominio de unión al ácido siálico de una proteína de la cápside de VJC tienen propiedades de unión baja al ácido siálico. En algunas realizaciones, se predice que las variantes específicas descritas en la presente memoria tienen propiedades de unión baja al ácido siálico.

Según los aspectos de la invención, los sujetos que albergan variantes de VJC con una o más mutaciones que se predice que reducen la unión al ácido siálico se identifican como que tienen una mayor susceptibilidad a la LMP (p. ej., en comparación con un sujeto que no alberga VJC o dicha variante de VJC), particularmente si su sistema inmune está comprometido. Por consiguiente, los sujetos que albergan una variante de VJC de unión reducida al ácido siálico presentan riesgo de desarrollar LMP si se tratan con un fármaco inmunosupresor (p. ej., natalizumab u otro fármaco inmunosupresor).

En algunas realizaciones, las mutaciones de VJC que están asociadas con la susceptibilidad a LMP en un sujeto son mutaciones en las posiciones 122, 2 y 66 y delecciones de los aminoácidos 50-51, 123-125 y 126-134 en la proteína de la cápside VP1 de VJC. En algunas realizaciones, las mutaciones de VJC que están asociadas con la susceptibilidad a LMP en un sujeto son H122R, A2V y D66G. En algunas realizaciones, las mutaciones de VJC que están asociadas con la susceptibilidad a LMP en un sujeto son H122R, A2V y D66G y 2831. En algunas realizaciones, un sujeto es susceptible a LMP si la proteína de la cápside VP1 de VJC comprende una sustitución de al menos uno de los residuos de aminoácidos 122, 2, 66, 55, 60, 265, 267 y 269, o una o más delecciones de los amino ácidos 50-51, 123-125 y 126-134.

Los aspectos de la invención son útiles para ayudar en la selección y/o monitorización de una terapia para un sujeto que necesita un tratamiento inmunosupresor (p. ej., un sujeto con esclerosis múltiple o cualquier otra afección que pueda tratarse con uno o más fármacos inmunosupresores). En algunas realizaciones, se pueden usar aspectos de la invención para identificar sujetos que son susceptibles a LMP antes de iniciar un tratamiento inmunosupresor. En algunas realizaciones, los sujetos que están recibiendo un tratamiento inmunosupresor pueden ser monitorizados para determinar la aparición de variantes de VJC que están asociadas con un mayor riesgo de LMP. En algunas realizaciones, si se identifica que un sujeto tiene una variante de VJC con unión reducida al ácido siálico, entonces el sujeto i) no se trata con un fármaco inmunosupresor, ii) se trata con una dosificación o frecuencia baja de administración del fármaco, y/o iii) se monitoriza regularmente para determinar síntomas tempranos de LMP. Si aparecen síntomas de LMP durante el tratamiento, el tratamiento puede detenerse o puede reducirse la cantidad o frecuencia de la administración del fármaco. En algunas realizaciones, un fármaco inmunosupresor alternativo puede sustituir a un primer fármaco si están presentes uno o más síntomas de LMP.

Se pueden usar aspectos de la invención para implementar procedimientos de monitorización de pacientes. En algunas realizaciones, los pacientes se ensayan primero para determinar si han estado expuestos al VJC (p. ej., ensayando el suero del paciente para determinar la presencia de un anticuerpo de VJC). Los pacientes que no han estado expuestos a VJC se identifican como que presentan un riesgo bajo de LMP. Sin embargo, en algunas realizaciones, dichos pacientes se monitorizan periódicamente para determinar si están expuestos a VJC o cuándo. Si se identifican signos de exposición a VJC en un sujeto antes del tratamiento o durante el tratamiento, entonces el

sujeto puede ser evaluado para determinar la presencia de una o más variantes de VJC asociadas con un mayor riesgo de LMP (p. ej., una o más variantes que se predice que tienen unión reducida al ácido siálico en relación con una forma normal o de tipo salvaje de VJC). Los pacientes pueden ser monitorizados periódicamente para determinar la presencia de variantes de VJC asociadas a LMP. Si se encuentra que un paciente alberga una o más variantes de VJC asociadas a LMP, entonces el paciente puede ser monitorizado cuidadosamente para determinar signos de LMP, el tratamiento del paciente puede detenerse o alterarse y/o el paciente puede ser tratado con uno o más fármacos profilácticos o terapéuticos para ayudar a proteger al paciente de la LMP.

En algunas realizaciones, un paciente o sujeto se monitoriza diariamente, semanalmente, quincenalmente, mensualmente, bimestralmente, trimestralmente, dos veces al año, anualmente o cada dos años. En algunas realizaciones, un paciente o sujeto se monitoriza cuando el paciente o sujeto está recibiendo tratamiento con inmunosupresores.

Se puede predecir que una variante de VJC tiene una unión baja al ácido siálico (p. ej., afinidad o avidez) si la variante tiene una o más mutaciones en el bolsillo de unión siálico de la proteína VP1 de VJC. En algunas realizaciones, se puede predecir que las mutaciones en uno cualquiera o más de los aminoácidos que están dentro de los 12 Angstroms de una molécula unida en el bolsillo de unión del ácido siálico afectan la unión del ácido siálico. En la Tabla 16 del Ejemplo 12 se proporciona una lista de aminoácidos de VP1 dentro de los 12 Angstroms de una molécula unida al bolsillo de unión al ácido siálico. Por consiguiente, una variante de VJC con una mutación en uno o más de estos aminoácidos puede identificarse como un candidato para una unión reducida al ácido siálico y, por lo tanto, un mayor riesgo de causar LMP.

Según los aspectos de la invención, varias secuencias diferentes de VP1 de VJC de origen natural pueden usarse como secuencias de referencia normales o de tipo salvaje si son de variantes de VJC que no están asociadas con un mayor riesgo de LMP, como se describe en la presente memoria. Los ejemplos de dichas secuencias de referencia se describen con más detalle en la presente memoria y, por ejemplo, en Cubitt et al., Predicted amino acid sequences for 100 JCV strains, *Journal of NeuroVirology*, 7: 339-344, 2001.

Las propiedades de unión al ácido siálico (p. ej., afinidad o avidez) de un VJC variante pueden medirse usando cualquier ensayo adecuado. Por ejemplo, la unión de VJC o VP1 de VJC al ácido siálico se puede medir usando ensayos de hemaglutinación, unión directa a moléculas inmovilizadas (p. ej., gangliósidos, azúcares, glicoproteínas, etc.), ensayos de unión basados en células (p. ej., donde se detecta la unión con anticuerpos marcados usando citometría de flujo), etc., o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la unión baja es una reducción de más de 5 veces en la unión (p. ej., avidez o afinidad) con respecto a la unión de una referencia de VJC normal o de tipo salvaje como se describe en la presente memoria. Sin embargo, en algunas realizaciones, la unión baja es una reducción de más de aproximadamente 10 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces, 1.000 veces, 5.000, 10.000 veces o mayor de la unión respecto a una referencia de VJC normal o de tipo salvaje.

Por consiguiente, los aspectos de la invención se refieren a determinar si un sujeto es susceptible a LMP debido a la presencia de una variante de VJC asociada a LMP. En algunas realizaciones, esta información puede usarse para determinar si el sujeto es adecuado para el tratamiento con un agente inmunosupresor. En algunas realizaciones, esta información puede usarse para determinar si un sujeto que está siendo tratado con un agente inmunosupresor debe continuar el tratamiento o debe cambiarse a una dosificación, régimen y/o tipo de fármaco inmunosupresor diferente. En determinadas realizaciones, la detección de una variante de VJC asociada a LMP en un sujeto que está siendo tratado con un agente inmunosupresor proporciona una base para interrumpir el tratamiento, al menos durante un período de tiempo predeterminado.

Los pacientes que están siendo tratados con un agente inmunosupresor pueden ser monitorizados periódicamente para determinar la presencia de una infección por VJC. En algunas realizaciones, si se sabe o se identifica que un sujeto tiene una infección por VJC, el sujeto puede ser monitorizado periódicamente para determinar la presencia de una variante de VJC que se predice que tiene una unión reducida para el ácido siálico.

Por consiguiente, la invención proporciona métodos y composiciones para determinar si un sujeto presenta riesgo de leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) o tiene LMP (p. ej., LMP en estadio temprano). En una realización, una muestra biológica de un sujeto se examina para determinar la exposición a un virus JC variante que tiene una o más variaciones de secuencia asociadas con LMP, por ejemplo, una o más variantes de secuencia que se predice que darán como resultado una unión reducida al ácido siálico. En algunas realizaciones, se examina una pluralidad de posiciones de VP-1 predeterminadas específicas para determinar su estado mutacional. El patrón de variaciones de secuencia que se encuentran en las posiciones específicas proporciona un perfil de riesgo del sujeto para LMP.

En algunas realizaciones, la invención proporciona paneles de posiciones de aminoácidos de VJC-VP1 en los que las variaciones de secuencia están asociadas con el riesgo de LMP y/o la progresión de la enfermedad LMP. Se proporcionan métodos y composiciones para ensayar muestras biológicas para detectar indicios de riesgo de LMP. En algunas realizaciones, los polipéptidos y/o ácidos nucleicos del virus JC pueden aislarse y analizarse para determinar si tienen variaciones de secuencia en una o más posiciones de VP-1 predeterminadas. Sin embargo, en determinadas circunstancias, el virus JC puede ser difícil de aislar de determinadas muestras biológicas obtenidas de sujetos que tienen cargas virales de JC bajas incluso si han estado expuestos al virus JC y pueden tener una infección

viral de JC actual. No obstante, la exposición de un sujeto a un virus JC variante asociado a LMP puede inferirse de la presencia, en una muestra biológica obtenida del sujeto, de anticuerpos (p. ej., anticuerpos séricos) frente a uno o más polipéptidos de VJC-VP1 variantes asociados a LMP.

5 Las secuencias de VJC en el cerebro de pacientes con LMP son tan variables que nunca se han detectado secuencias idénticas de VJC en diferentes pacientes con LMP (Yogo y Sugimoto, 2001). Sin embargo, los aspectos de la invención se basan en un análisis de las secuencias de VJC de sujetos sanos y con LMP y en la identificación de un subconjunto de posiciones en la secuencia de VP1 en el que las sustituciones de aminoácidos están fuertemente correlacionadas con la LMP. En un aspecto, la invención proporciona una guía en cuanto a qué posiciones en VJC-VP1 necesitan ser examinadas para llegar a un perfil de riesgo para LMP. En un aspecto, la invención proporciona nuevos paneles de
10 posiciones de aminoácidos de VP1 en los que las variaciones de secuencia son predictivas de un riesgo de LMP en un sujeto infectado con el correspondiente VJC variante. Los aspectos de la invención se refieren al cribado de sujetos para determinar la presencia de signos o indicios de variantes de VJC con unión reducida al ácido siálico. En algunas realizaciones, en la Tabla 1A-1H se proporcionan paneles de variaciones de secuencia de VJC asociadas con diferentes perfiles de riesgo de LMP y se describen con más detalle en la presente memoria.

15 VJC y VP1

En algunas realizaciones, las variaciones de secuencia de VJC asociadas con LMP se encuentran en posiciones seleccionadas en la proteína de la cápside principal (VP1) de VJC. Se han analizado las secuencias de muchas proteínas VP1 descritas en la bibliografía para identificar un subconjunto de posiciones de VP1 donde las variaciones de secuencia están fuertemente asociadas con LMP. Según la invención, un aminoácido se identifica como mutante o variante en una posición específica en VP-1 si difiere del aminoácido en esa posición en una secuencia consenso u otra secuencia de referencia (p. ej., la secuencia de un virus arquetipo de tipo salvaje). En algunas realizaciones, la secuencia consenso para la proteína VP1 de VJC de sujetos sanos es proporcionada por GenBank No. de ID 37050849 (AAQ88264; mostrada como la secuencia de VP1 en la FIG. 1). VJC-VP1 está conservada cuando se compara con SV40 como se muestra en la FIG. 1. Se han identificado varios arquetipos diferentes de VJC. Tal y como se usa en la presente memoria, un arquetipo es un VJC que se encuentra en la orina de individuos sanos. En algunas realizaciones, la secuencia de VP1 de la FIG. 1 es una secuencia de referencia. En algunas realizaciones, una secuencia de referencia es uno o más de los arquetipos de Zheng et al. (2005). Los tres arquetipos principales están determinados por región (el arquetipo de la UE se encuentra en personas de ascendencia europea y los arquetipos CY y MY se encuentran en personas de ascendencia asiática). Si bien las variaciones de secuencia asociadas a LMP se identificaron tomando como base comparaciones con una secuencia "consenso", varios arquetipos tienen los mismos aminoácidos en las posiciones identificadas como asociadas a LMP y, por lo tanto, la invención se puede llevar a la práctica tomando como base comparaciones de secuencias con cualquiera de las secuencias arquetipo. En otras realizaciones, los ensayos pueden basarse en la determinación de si un VJC tiene uno o más aminoácidos predeterminados en determinadas posiciones sin realizar una comparación con una secuencia de referencia. Debe apreciarse que los métodos para determinar la presencia de determinadas secuencias variantes de VJC-VP1 pueden basarse en una caracterización directa de ácidos nucleicos o polipéptidos de VJC aislados de un sujeto. Alternativamente, la presencia de VJC variante en un sujeto (o exposición previa del sujeto a VJC variante) puede inferirse detectando anticuerpos del sujeto (p. ej., anticuerpos séricos) que son específicos para una o más de las secuencias de VJC-VP1 variantes. Debe apreciarse que los aspectos de la invención también proporcionan la comparación de una secuencia de VJC-VP1 con otras secuencias de referencia. Sin embargo, incluso si se usan otras secuencias de referencia, un análisis puede implicar la determinación de la identidad de un aminoácido en una o más de las posiciones de VP1 asociadas a LMP descritas en la presente memoria.

Según la invención, el análisis de la secuencia de variantes de VP1 identificó regiones de "puntos calientes" de variaciones de secuencia asociadas con el riesgo de LMP. En algunas realizaciones, las variaciones de secuencia que son indicativas de riesgo de LMP se localizan en los bucles superficiales de la proteína VP1. Estas posiciones se pueden encontrar en las Tablas 1B-1D. En algunas realizaciones, el número total de variaciones de secuencia en un área específica de la proteína VP1 puede ser indicativo de riesgo de LMP (Véase la Tabla 2). En algunas realizaciones, la presencia de aminoácidos variantes en 2 o más (p. ej., 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) de las posiciones descritas en la presente memoria puede ser indicativa de riesgo de LMP. La polaridad de estas regiones puede ser indicativa de riesgo de LMP y el riesgo de LMP puede aumentar si los aminoácidos polares se reemplazan por aminoácidos no polares. En algunas realizaciones, una pérdida de un aminoácido polar en una cualquiera o más de las posiciones identificadas en la Tabla 1A o las Tablas 1B-1D da como resultado un virus VJC que tiene una asociación aumentada con LMP. En algunas realizaciones, una pérdida de un aminoácido polar en una cualquiera o más posiciones en una de las regiones estructurales mostradas en la FIG. 2 (p. ej., en una región definida por las posiciones 55-75 o 265-271 de la secuencia del polipéptido de VJC-VP1) da como resultado un virus JC que tiene una asociación aumentada con LMP. De manera similar, en determinadas realizaciones, una ganancia de un aminoácido no polar en una cualquiera o más de las posiciones identificadas en la Tabla 1A o las Tablas 1B-1D da como resultado un virus VJC que tiene una asociación incrementada con LMP. Además, en determinadas realizaciones, una ganancia de un aminoácido no polar en una cualquiera o más posiciones en una de las regiones estructurales mostradas en la FIG. 2 (p. ej., en una región definida por las posiciones 55-75 o 265-271 de la secuencia del polipéptido VJC-VP1) da como resultado un virus JC que tiene una asociación aumentada con LMP. La FIG. 2 muestra una estructura de VJC-VP1 predicha que resalta las regiones donde determinadas posiciones de aminoácidos identificadas como asociadas con LMP se mapearon en la estructura. La estructura predicha de la proteína VJC-VP1 se basa en la estructura cristalina de la

proteína 1 de la cubierta de SV40 y la similitud de secuencia entre las proteínas VJC y SV40. El análisis de las variaciones de secuencia mostró que una disminución en el número de aminoácidos polares y/o un aumento en el número de aminoácidos no polares en el área superficial de la proteína VP1 dio como resultado un mayor riesgo de LMP (Véase el Ejemplo 3). En una realización, un sujeto presenta riesgo de LMP si una variación de secuencia en uno o más de los bucles de superficie da como resultado un aumento en el área superficial no polar de 10 angstrom cuadrados o más por variación de secuencia, o una disminución en el área superficial polar de 10 angstrom cuadrados o más por variación de secuencia. Si bien la presente invención no se limita a un mecanismo específico, se cree que los cambios en el bucle de superficie pueden impedir que los anticuerpos se unan al VJC-VP1 y/o facilitar la interacción de la VP1 de VJC con sus receptores, tales como carbohidratos y/o un receptor proteico, tal como 5HT2A. Los cambios en un bucle de superficie de VP1 (p. ej., un aumento de aminoácidos no polares o área superficial y/o una disminución de aminoácidos polares o área superficial) pueden aumentar la afinidad de VP1 por el receptor celular y facilitar la entrada viral y/o la infección de una célula huésped, o determinadas células huésped específicas importantes para la progresión de la LMP.

Paneles de variaciones de secuencia

Debe apreciarse que el examen de una posición puede comprender tanto determinar el aminoácido en esa posición como comparar ese aminoácido con un aminoácido de referencia (p. ej., el aminoácido que se encuentra en la variante de tipo salvaje/control, por ejemplo, en la secuencia consenso o una secuencia arquetipo).

Debe apreciarse que cualquier variante única o combinación de variantes puede ser indicativa de riesgo de LMP. Debe apreciarse que el número total de variantes presentes en una determinada región o en un grupo seleccionado de variantes examinadas puede indicar un riesgo de LMP.

Los aspectos de la invención se refieren a proporcionar una o más posiciones en una secuencia de aminoácidos de VJC-VP1 que corresponden a variantes de VJC que están asociadas con el riesgo de LMP. Por ejemplo, cada una de las posiciones que se muestran en la Tabla 1A están asociadas con el riesgo de LMP y se puede usar cualquier ensayo adecuado para detectar la presencia de, o indicadores (indicios) de exposición pasada a, una variante de VJC que tiene una variante de aminoácidos en una o más de las posiciones seleccionadas. En algunas realizaciones, se puede usar un ensayo para detectar la presencia de, o exposición a, una variante de VJC que tiene una variante de aminoácido variante en dos o más posiciones seleccionadas de las posiciones listadas en la Tabla 1A, en donde la presencia de la variante/variantes es indicativa de LMP.

En algunas realizaciones, las mutaciones de VJC que están asociadas con la susceptibilidad a LMP en un sujeto son mutaciones en las posiciones 122, 2 y 66 y deleciones de los aminoácidos 50-51, 123-125 y 126-134 en la proteína de la cápside VP1 de VJC. En algunas realizaciones, las mutaciones de VJC que están asociadas con la susceptibilidad a LMP en un sujeto son H122R, A2V y D66G. En algunas realizaciones, un sujeto es susceptible a LMP si la proteína de la cápside VP1 de VJC comprende una sustitución de al menos uno de los residuos de aminoácidos 122, 2, 66, 55, 60, 265, 267 y 269, o una o más deleciones de los aminoácidos 50-51, 123-125 y 126-134.

En algunas realizaciones, las posiciones seleccionadas se examinan comparando el aminoácido presente en esa posición con el aminoácido presente en una referencia. Si el aminoácido presente en una posición seleccionada difiere del aminoácido encontrado en la referencia, se dice que la posición está mutada. Por consiguiente, en algunos aspectos, la invención proporciona tablas (p. ej., bases de datos) que contienen listas de variantes que están relacionadas con un riesgo de LMP. Las bases de datos también proporcionan variantes y variantes que protegen de la LMP. En algunas realizaciones, cualquier variante encontrada en una posición seleccionada es indicativa de riesgo de LMP. En realizaciones adicionales, las tablas proporcionan grupos de variantes asociadas con LMP que se pueden examinar como grupo para llegar a un perfil de riesgo de LMP para un sujeto. Debe apreciarse que muchas de las variantes identificadas en la base de datos de referencia no son muy comunes. Por ejemplo, una variante indicativa de riesgo de LMP se puede encontrar en solo el 10 % de las muestras de una persona que se sabe que presenta riesgo de LMP. Para llegar a un perfil de riesgo para un sujeto, es posible que sea necesario examinar más de una posición. Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona tablas de grupos de posiciones y número de posiciones dentro de ese grupo que necesitan identificarse para llegar a un perfil de riesgo de LMP. En algunas realizaciones, es necesario examinar al menos 8 (p. ej., 8, 9, 10 o más, o todas) posiciones en la Tabla 1A para llegar al perfil de riesgo de un sujeto para LMP. De manera similar, se pueden examinar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más o todas las posiciones en cualquiera de las tablas.

Los aminoácidos que se encuentran en las posiciones indicadas en las Tablas pueden ser indicativos de riesgo de LMP al comparar el aminoácido con un aminoácido encontrado en una referencia. Por ejemplo, en la Tabla 1A, el aminoácido de tipo salvaje (p. ej., referencia/consenso) en la posición 55 es leucina (L). En algunas realizaciones, cualquier aminoácido encontrado en la posición 55 que no sea leucina es indicativo de riesgo de LMP. En algunas realizaciones, una variante particular está asociada con riesgo de LMP. Por ejemplo, la presencia de una fenilalanina (F) en la posición 55 puede ser indicativa de riesgo de LMP. Por consiguiente, la aparición de un aminoácido variante (p. ej., Phe) en la posición 55 puede ser indicativa del inicio o progresión de la LMP. De manera similar, la aparición de una o más de otras variantes de aminoácidos descritas en la presente memoria para las posiciones asociadas con LMP en VP1 puede ser indicativa del inicio o progresión de la LMP. En algunas realizaciones, la presencia de un

aminoácido con una característica particular puede ser indicativa del riesgo de LMP. Por ejemplo, la presencia en la variante de VJC de un aminoácido que es menos polar que el aminoácido que se encuentra en la secuencia de referencia, es indicativa de riesgo de LMP. Además de ser indicativas de riesgo de LMP, las variantes encontradas en posiciones específicas también pueden usarse para determinar el inicio, progresión o regresión en un sujeto. En algunas realizaciones, las variantes encontradas en posiciones específicas permiten la monitorización del tratamiento de un sujeto para LMP. En algunas realizaciones, las variantes encontradas en posiciones específicas permiten la selección de un tratamiento de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene LMP.

En algunas realizaciones, los aminoácidos que se encuentran en posiciones amino específicas pueden ser indicativos como protectores de la LMP, p. ej., identificando a la persona por presentar un riesgo menor de desarrollar LMP.

Debe apreciarse que, en algunas realizaciones, el riesgo de LMP puede determinarse sin comparar el aminoácido determinado en una posición particular con una secuencia de referencia. Por ejemplo, si en una muestra se examina la posición 55 y el aminoácido encontrado en esa posición es una fenilalanina, entonces se determina que el sujeto presenta riesgo de LMP. Esta determinación se puede realizar sin comparar el aminoácido que se encuentra en la posición 55 con una referencia de tipo salvaje.

Debe apreciarse que la invención proporciona métodos para determinar tanto la existencia actual como pasada de variantes de VJC. Se puede determinar que un sujeto que ha estado expuesto a una variante de VJC, pero que actualmente no se puede identificar como infectado con esa variante de VJC, está expuesto a esa variante de VJC determinando la presencia de indicadores para esa variante de VJC. Un sujeto puede desarrollar anticuerpos frente a cualquier agente extraño, incluyendo virus y bacterias, al que está expuesto el sujeto. Por lo tanto, la presencia de un virus, o variante del virus, en un sujeto puede diagnosticarse mediante la detección de un anticuerpo específico para ese virus o variante de virus. Si el virus se replica y muta (y, por lo tanto, crea una nueva variante), el cuerpo desarrollará nuevos anticuerpos específicos para la versión mutada del virus. Incluso si una variante de virus específica ya no está presente en el cuerpo, la exposición pasada a la variante aún puede determinarse por la presencia del anticuerpo. Por consiguiente, en una realización, el estado mutacional de las variantes de VJC (tanto exposición actual como pasada) se determina mediante la detección de la presencia de anticuerpos frente a una o más variantes específicas. En una realización, la presencia de un anticuerpo de VP1 se determina mediante la unión específica del anticuerpo a uno o más polipéptidos que comprenden una o más de las variantes. Debe apreciarse que los anticuerpos se pueden determinar cualitativa y cuantitativamente. Por lo tanto, un ensayo de detección de anticuerpos de la invención facilita la determinación de todas las variantes virales a las ha estado expuesto alguna vez el sujeto y una estimación de la carga viral de variantes actualmente presentes en el cuerpo mediante la cuantificación de los anticuerpos específicos.

En una realización, las variantes de aminoácidos se detectan directamente, p. ej., la presencia de variantes del virus en un sujeto se determina determinando la presencia de polipéptidos que comprenden una o más variantes de las variantes. Se desarrollan agentes que pueden unirse específicamente a un polipéptido particular. En algunas realizaciones, estos agentes son anticuerpos. En algunas realizaciones, las variantes se determinan determinando la secuencia de los ácidos nucleicos que codifican las variantes. Se obtiene una muestra de un sujeto y se analiza para determinar la presencia de una variante de virus particular. Debe apreciarse que las variantes específicas de VJC solo pueden estar presentes en el cerebro y el líquido cefalorraquídeo, mientras que las variantes de "tipo salvaje" pueden estar presentes en otros tejidos del mismo sujeto. La presencia de polipéptidos puede determinarse mediante anticuerpos específicos para esos polipéptidos. El ensayo permitirá la determinación tanto de la presencia de variantes específicas como la cuantificación de estas variantes (la carga viral), además se puede determinar la relación de variante a tipo salvaje.

Debe apreciarse que un agente inmunosupresor puede aumentar la susceptibilidad de un sujeto a la progresión o exacerbación de una infección microbiana latente o a contraer una nueva infección microbiana. En algunas realizaciones, la infección microbiana es una infección por VJC, que causa LMP. Por consiguiente, el riesgo de LMP puede evaluarse antes de iniciar el tratamiento con un agente inmunosupresor, durante la administración de un agente inmunosupresor, o evaluarse después de que se haya administrado un agente inmunosupresor o después de que se haya terminado el tratamiento con un tratamiento inmunosupresor.

En algunas realizaciones, el riesgo de LMP según lo determinado por los métodos de la invención ayudará a decidir el tratamiento con inmunosupresores o agentes inmunosupresores. En algunas realizaciones, un mayor riesgo de LMP diagnosticado durante el tratamiento con inmunosupresores puede sugerir una modificación o terminación del régimen de tratamiento con inmunosupresores.

Tabla 1A: Panel de variantes de VJC-VP1

VP1 de VJC	Individuos sanos				Pacientes con LMP (tejido cerebral + periférico)				Pacientes con LMP (tejido periférico)				Pacientes con LMP (tejido cerebral)			
	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut
55 L	29	0	0		50	5	10	5F	13	3	23	3F	37	2	5	2F
60 K	29	0	0		50	4	8	2M 1E 1N	13	1	8	1N	37	3	8	2M 1E
61 S	29	0	0		50	1	2	1L	13	0	0		37	1	3	1L
66 D	29	0	0		50	5	10	4H 1N	13	0	0		37	5	14	4H 1N
69 E	29	0	0		50	1	2	1D	13	0	0		37	1	3	1D
74 N	29	0	0		50	4	8	4S	13	0	0		37	4	11	4S
75 K	29	0	0		50	3	6	3R	13	0	0		37	3	8	3R
113 I	41	3	7	3L	50	18	36	18L	13	5	38	5L	37	13	35	13L
117 T	41	1	2	1S	50	8	16	8S	13	0	0		37	8	22	8S
123 S	41	0	0		50	4	8	4C	13	2	15	2C	37	2	5	2C
128 T	41	2	5	2A	50	6	12	6A	13	0	0		37	6	16	6A
134 A	41	20	49	20G	50	47	94	47G	13	10	77	10G	37	37	100	37 G
158 V	29	0	0		50	4	8	4L	13	0	0		37	4	11	4L
164 T	29	5	17	5K	50	46	92	46K	13	10	77	10K	37	36	97	36 K
223 V	42	0	0		52	1	2	1A	14	0	0		38	1	3	1A
265 N	42	0	0		52	4	8	3D 1T	14	4	29	3D 1T	38	0	0	
267 S	42	0	0		52	4	8	3F 1L	14	1	7	1F	38	3	8	2F 1L
269 S	42	0	0		52	12	23	9F 3Y	14	1	7	1F	38	11	29	8F 3Y
271 Q	42	0	0		52	1	2	1H	14	0	0		38	1	3	1H
321 I	42	20	48	20V	32	28	88	28V	5	1	20	1V	27	27	100	27 V
332 Q	42	20	48	20E	32	29	91	29E	5	2	40	2E	27	27	100	27 E
345 R	42	0	0		32	8	25	8K	5	0	0		27	8	30	8K

Tabla 1B. Panel de variantes de VJC-VP1 del Grupo I

VP1 de VJC	Individuos sanos				Pacientes con LMP (tejido cerebral + periférico)				Pacientes con LMP (tejido periférico)				Pacientes con LMP (tejido cerebral)			
	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut
posWT																

ES 2 842 425 T3

VP1 de VJC	Individuos sanos				Pacientes con LMP (tejido cerebral + periférico)				Pacientes con LMP (tejido periférico)				Pacientes con LMP (tejido cerebral)			
	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut
55 L	29	0	0		50	5	10	5F	13	3	23	3F	37	2	5	2F
60 K	29	0	0		50	4	8	2M 1E 1N	13	1	8	1N	37	3	8	2M 1E
61 S	29	0	0		50	1	2	1L	13	0	0		37	1	3	1L
66 D	29	0	0		50	5	10	4H 1N	13	0	0		37	5	14	4H 1N
69 E	29	0	0		50	1	2	1D	13	0	0		37	1	3	1D
74 N	29	0	0		50	4	8	4S	13	0	0		37	4	11	4S
75 K	29	0	0		50	3	6	3R	13	0	0		37	3	8	3R

Tabla 1C. Panel de variantes de VJC-VP1 del Grupo II

VP1 de VJC	Individuos sanos				Pacientes con LMP (tejido cerebral + periférico)				Pacientes con LMP (tejido periférico)				Pacientes con LMP (tejido cerebral)		
	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut
265 N	42	0	0		52	4	8	3D 1T	14	4	29	3D 1T	38	0	0
267 S	42	0	0		52	4	8	3F 1L	14	1	7	1F	38	3	8
269 S	42	0	0		52	12	23	9F 3Y	14	1	7	1F	38	11	29
271 Q	42	0	0		52	1	2	1H	14	0	0		38	1	3

Tabla 1D. Panel de variantes de VJC-VP1 del Grupo III

VP1 de VJC	Individuos sanos				Pacientes con LMP (tejido cerebral + periférico)				Pacientes con LMP (tejido periférico)				Pacientes con LMP (tejido cerebral)			
	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut
113 I	41	3	7	3L	50	18	36	18L	13	5	38	5L	37	13	35	13L
123 S	41	0	0		50	4	8	4C	13	2	15	2C	37	2	5	2C
158 V	29	0	0		50	4	8	4L	13	0	0		37	4	11	4L
164 T	29	5	17	5K	50	46	92	46K	13	10	77	10K	37	36	97	36K
345 R	42	0	0		32	8	25	8K	5	0	0		27	8	30	8K

Tabla 1E: Panel de variantes de VJC-VP1 de los Grupos I-III

VP1 de VJC	Individuos sanos				Pacientes con LMP (tejido cerebral + periférico)				Pacientes con LMP (tejido periférico)				Pacientes con LMP (tejido cerebral)			
	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut
55 L	29	0	0		50	5	10	5F	13	3	23	3F	37	2	5	2F
60 K	29	0	0		50	4	8	2M 1E 1N	13	1	8	1N	37	3	8	2M 1E
61 S	29	0	0		50	1	2	1L	13	0	0		37	1	3	1L
66 D	29	0	0		50	5	10	4H 1N	13	0	0		37	5	14	4H 1N
69 E	29	0	0		50	1	2	1D	13	0	0		37	1	3	1D
74 N	29	0	0		50	4	8	4S	13	0	0		37	4	11	4S
75 K	29	0	0		50	3	6	3R	13	0	0		37	3	8	3R
113 I	41	3	7	3L	50	18	36	18L	13	5	38	5L	37	13	35	13L
123 S	41	0	0		50	4	8	4C	13	2	15	2C	37	2	5	2C
158 V	29	0	0		50	4	8	4L	13	0	0		37	4	11	4L
164 T	29	5	17	5K	50	46	92	46K	13	10	77	10K	37	36	97	36K
265 N	42	0	0		52	4	8	3D 1T	14	4	29	3D 1T	38	0	0	
267 S	42	0	0		52	4	8	3F 1L	14	1	7	1F	38	3	8	2F 1L
269 S	42	0	0		52	12	23	9F 3Y	14	1	7	1F	38	11	29	8F 3Y
271 Q	42	0	0		52	1	2	1H	14	0	0		38	1	3	1H
345 R	42	0	0		32	8	25	8K	5	0	0		27	8	30	8K

Tabla 1F. Panel de variantes de VJC-VP1 encontradas en la mayoría de las muestras de cerebro de LMP

VP1 de VJC	Individuos sanos				Pacientes con LMP (tejido cerebral + periférico)				Pacientes con LMP (tejido periférico)				Pacientes con LMP (tejido cerebral)			
	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut
134 A	41	20	49	20G	50	47	94	47G	13	10	77	10G	37	37	100	37G
164 T	29	5	17	5K	50	46	92	46K	13	10	77	10K	37	36	97	36K
321 I	42	20	48	20V	32	28	88	28V	5	1	20	1V	27	27	100	27V
332 Q	42	20	48	20E	32	29	91	29E	5	2	40	2E	27	27	100	27E

Tabla 1G. Panel de variantes de riesgo de VJC-VP1 no encontradas en muestras de individuos sanos

VP1 de VJC	Individuos sanos				Pacientes con LMP (tejido cerebral + periférico)				Pacientes con LMP (tejido periférico)				Pacientes con LMP (tejido cerebral)			
	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut
55 L	29	0	0		50	5	10	5F	13	3	23	3F	37	2	5	2F
60 K	29	0	0		50	4	8	2M 1E 1N	13	1	8	1N	37	3	8	2M 1E
61 S	29	0	0		50	1	2	1L	13	0	0		37	1	3	1L
66 D	29	0	0		50	5	10	4H 1N	13	0	0		37	5	14	4H 1N
69 E	29	0	0		50	1	2	1D	13	0	0		37	1	3	1D
74 N	29	0	0		50	4	8	4S	13	0	0		37	4	11	4S
75 K	29	0	0		50	3	6	3R	13	0	0		37	3	8	3R
123 S	41	0	0		50	4	8	4C	13	2	15	2C	37	2	5	2C
158 V	29	0	0		50	4	8	4L	13	0	0		37	4	11	4L
223 V	42	0	0		52	1	2	1A.	14	0	0		38	1	3	1A.
265 N	42	0	0		52	4	8	3D 1T	14	4	29	3D 1T	38	0	0	
267 S	42	0	0		52	4	8	3F 1L	14	1	7	1F	38	3	8	2F 1L
269 S	42	0	0		52	12	23	9F 3Y	14	1	7	1F	38	11	29	8F 3Y

VP1 de VJC	Individuos sanos			Pacientes con LMP (tejido cerebral + periférico)				Pacientes con LMP (tejido periférico)			Pacientes con LMP (tejido cerebral)			
	no. sec	no. mut	% mut	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	no. sec	no. mut	% mut	mut
271 Q	42	0	0	52	1	2	1H	14	0	0	38	1	3	1H
345 R	42	0	0	32	8	25	8K	5	0	0	27	8	30	8K

Tabla 1H. Panel de variantes de VJC-VP1 encontradas en individuos sanos

VP1 de VJC	Individuos sanos				Pacientes con LMP (tejido cerebral + periférico)				Pacientes con LMP (tejido periférico)				Pacientes con LMP (tejido cerebral)			
	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut	no. sec	no. mut	% mut	mut
posWT																
115 V	41	1	2	1E	50	0	0		13	0	0		37	0	0	
277 R	42	1	2	1K	52	0	0		14	0	0		38	0	0	

Tabla 2A: Sujetos sanos

SECUENCIA	No. MUT	No. REGIÓN	LONGITUD	VARIANTES
AAQ88264_gi 37050849 gb AAQ	0	0	347	CONSENSO
AAB60589_gi 1161330 gb AAB6	2	0	27	128 A 134 G
AAC54623_gi 1161332 gb AAC5	0	0	27	
AAG48112_gi 12056896 gb AAG	2	0	142	321 V 332 E
AAG48114_gi 12056899 gb AAG	2	0	142	321 V 332 E
AAG48119_gi 12056907 gb AAG	2	0	142	321 V 332 E
AAG48121_gi 12056910 gb AAG	2	0	142	321 V 332 E
AAG48123_gi 12056913 gb AAG	2	0	142	321 V 332 E
AAG48125_gi 12056916 gb AAG	2	0	142	321 V 332 E
AAG48127_gi 12056919 gb AAG	2	0	142	321 V 332 E
AAG48544_gi 12082440 gb AAG	1	0	56	134 G
AAG48545_gi 12082442 gb AAG	1	0	56	134 G
AAG48546_gi 12082444 gb AAG	1	0	56	134 G
AAG48547_gi 12082446 gb AAG	1	0	56	134 G
AAG48548_gi 12082446 gb AAG	1	0	56	134 G
AAG48549_gi 12082450 gb AAG	2	1	56	113 L 134 G
AAG48550_gi 12082452 gb AAG	2	1	56	113 L 134 G
AAG48551_gi 12082454 gb AAG	2	1	56	113 L 134 G
AAL12481_gi 16118426 gb AAL	2	0	142	321 V 332 E
AAL12483_gi 16118429 gb AAL	2	0	142	321 V 332 E
AAR06661_gi 37993002 gb AAR	0	0	347	
AAR12957_gi 38156673 gb AAR	1	0	347	134 G
AAR13077_gi 38176429 gb AAR	1	0	347	134 G
AAR13659_gi 38195910 gb AAR	0	0	347	
AAR32743_gi 39939397 gb AAR	0	0	347	
AAR89187_gi 40737215 gb AAR	0	0	347	
AAR89193_gi 40737222 gb AAR	0	0	347	
AAR89199_gi 40737229 gb AAR	0	0	347	
AAR89205_gi 40737236 gb AAR	0	0	347	
AAR89211_gi 40737243 gb AAR	1	0	347	277 K
AAR89217_gi 40737250 gb AAR	0	0	347	
AAR89223_gi 40737257 gb AAR	0	0	347	
AAR89229_gi 40737264 gb AAR	0	0	347	
AAR89235_gi 40737271 gb AAR	0	0	347	

ES 2 842 425 T3

SECUENCIA	No. MUT	No. REGIÓN	LONGITUD	VARIANTES
AAR89241_gi 40737278 gb AAR	0	0	347	
AAR89247_gi 40737285 gb AAR	0	0	347	
AAR89253_gi 40737292 gb AAR	0	0	347	
AAR89259_gi 40737299 gb AAR	1	0	347	134 G
AAR89265_gi 40737543 gb AAR	0	0	347	
AAR89271_gi 40737550 gb AAR	1	0	347	115 E
AAR89277_gi 40737557 gb AAR	0	0	347	
AAR89283_gi 40737564 gb AAR	0	0	347	
ABA60111_gi 76885940 gb ABA	0	0	58	
BAA01963_gi 425204 dbj BAA0	4	1	347	134 G 164 K 321 V 332 E
BAA01964_gi 425205 dbj BAA0	4	1	347	134 G 164 K 321 V 332 E
BAA07834_gi 772312 dbj BAA	2	0	134	321 V 332 E
BAA07836_gi 1785835 dbj BAA	2	0	134	321 V 332 E
BAA07838_gi 1785837 dbj BAA	2	0	134	321 V 332 E
BAA07840_gi 1772321 dbj BAA	2	0	134	321 V 332 E
BAB11698_gi 9796401 dbj BAB	4	1	347	134 G 164 K 321 V 332 E
BAB11704_gi 9796408 dbj BAB	4	1	347	134 G 164 K 321 V 332 E
BAB11716_gi 9796422 dbj BAB	3	0	347	134 G 321 V 332 E
BAB11722_gi 9796429 dbj BAB	3	0	347	134 G 321 V 332 E
Valores Promedio	1,2	0,1	234,7	

ES 2 842 425 T3

Tabla 2B: Muestras de LMP

Secuencia	no. mut	no. región	Longitud	Variantes
AAB62680_gi 2246607 gb AA	5	1	347	128 A 134 164 K321 V332 E G
AAT09819_gi 47078338 gb A	5	3	347	113L 134 164 K 265 T332 E G
AAT09825_gi 47078345 gb A	1	1	347	267 F
AAT09831_gi 47078352 gb A	1	1	347	55 F
AAT09837_gi 47078359 gb A	1	1	347	60 N
BAE02848_gi 68445641 dbj	4	3	246	113L 134 164 K 265 D G
BAE02849_gi 68445643 dbj	3	2	246	55 F 134 164 K G
BAE02850_gi 68445645 dbj	4	3	246	113 L 134 164 K 265 D G
BAE02851_gi 68445647 dbj	4	3	246	113 L 123 C 134 164 K G
BAE02852_gi 68445649 dbj	3	2	246	134 G 164 K269 F
BAE02853_gi 68445651 dbj	4	3	246	113 L 123 C 134 164 K G
BAE02854_gi 68445653 dbj	3	2	246	55F 134 164 K G
BAE02855_gi 68445655 dbj	2	1	246	134 G 164 K
BAE02856_gi 68445657 dbj	3	2	246	134 G 164 K265 D
AAB60586_gi 1161322 gb AAB	2	0	134	321 V 332 E Parcial
AAB60584_gi 1161319 gb AAB	2	0	134	321 V 332 E Parcial
AAB62687_gi 2246615 gb AAB	6	2	347	55F 128 A 134 164 K321 V332 E G
AAB94036_gi 2735983 gb AAB	4	1	347	55 F 134 321 V332 E G
BAA01965_gi 425206 dbj BAA	6	2	347	128 A 134 164 K 269 F321 V332 E G
BAA01966_gi 425207 dbj BAA	9	5	347	66 H 75 R 117S 134 158 L 164 K 321 V 332 345 K G E
BAA01967_gi 425208 dbj BAA	8	4	347	117S 134G 158 L 164 K267 L321 V 332 E 345 K
BAA01968_gi 425209 dbj BAA	8	3	347	74 S 117S 128 A 134 164 K321 V 332 E 345 G K
BAA01969_gi 425210 dbj BAA	6	3	347	113 L 134 164 K 269 F321 V332 E G
BAA01970_gi 425211 dbj BAA	5	2		113 L 134 164 K321 V332 E G

ES 2 842 425 T3

Secuencia	no. mut	no. región	Longitud	Variantes
BAA05636_gi 538231 dbj BAA	5	2	347	113L 134 164 K 321 V332 E G
BAA05637_gi 538234 dbj BAA	6	3	347	113 L 134 164 K 269 F321 V332 E G
BAA05638_gi 538238 dbj BAA	5	2	347	134 G 164 K 269 Y321 V332 E
BAB11728_gi 9796436 dbj BA	6	3	347	113 L 134 164 K 269 F321 V332 E G
BAB11734_gi 9796443 dbj BA	5	2	347	134 G 164 K 269 Y321 V332 E
BAE00111_gi 67968154 dbj B	8	3	347	74S 117S 128 A 134 164 K321 V 332 E 345 G K
BAE00117_gi 67968161 dbj B	9	4	347	74S 117S 128 A 134 164 K 269 F 321 V 332 337 K G E
BAE00123_gi 67969168 dbj B	9	4	347	74S 117S 128 A 134 164 K 269 F 321 V 332 337 K G E
BAE00129_gi 67968175 dbj B	4	1	347	134 G 164 K321 V332 E
BAE00135_gi 67968182 dbj B	5	2	347	61 L 134 164 K321 V332 E G
BAE00141_gi 67968189 dbj B	4	1	347	134 G 164 K321 V332 E
BAE00147_gi 67968204 dbj B	5	2	347	113 L 134 164 K321 V332 E G
BAE00153_gi 67968211 dbj B	6	3	347	113L 134 164 K 269 Y321 V332 E G
BAE00159_gi 67968218 dbj B	6	3	347	60 M 113 L 134 164 K321 V332 E G
BAE00165_gi 67968225 dbj B	6	3	347	113L 123 C 134 164 K321 V332 E G
BAE00171_gi 67968232 dbj B	6	3	347	105 L 123 C 134 164 K321 V332 E G
BAE02837_gi 68445619 dbj B	2	1	246	134 G 164 K
BAE02838_gi 68445621 dbj B	3	2	246	66 H 134 164 K G
BAE02839_gi 68445623 dbj B	3	2	246	66 H 134 164 K G
BAE02840_gi 68445625 dbj B	4	3	246	60 E 66 H 134 164 K G
BAE02841_gi 68445627 dbj B	4	3	246	113 L 134 164 K267 F G
BAE02842_gi 68445629 dbj B	4	3	246	60 M 134 164 K270 H G
BAE02843_gi 68445631 dbj B	3	2	246	66H 134 164 K G
BAE02844_gi 68445633 dbj B	4	3	246	113L 134G 164 K 269F

ES 2 842 425 T3

Secuencia	no. mut	no. región	Longitud	Variantes
BAE02845_gi 68445635 dbj B	4	3	246	113 L 134 164 K267 F G
BAE02846_gi 68445637 dbj B	3	1	246	134 G 164 K223 A
BAE02847_gi 68445639 dbj B	4	3	246	69 D 134 164 K269 F G
P03089_gi 116626 sp P03089	8	4	347	75 R 117 S 134 158 L 164 K321 V 332 E 345 G K
BAB11710_gi 9796415 dbj BAB	8	4	347	75 R 117S 134 158L 164 K321 V 332 E 345K MAD-1 G
Valores Promedio	4,7	2,4	300,8	

Diagnóstico

Por consiguiente, los métodos de la invención son útiles en un aspecto para determinar si un sujeto presenta riesgo de, o tiene, LMP tomando como base los paneles y grupos de variante/variantes de la invención. El ensayo de una muestra biológica de un sujeto para detectar un indicio de exposición a un VJC variante permitirá determinar si una persona presenta riesgo de, o tiene, LMP o está infectada por una variante de VJC asociada con LMP. La determinación de si un sujeto ha estado expuesto a, o está infectado con, una variante de VJC que tiene una variación de secuencia en una o más de las posiciones de VP1 descritas en la presente memoria permite evaluar si un sujeto presenta riesgo de LMP (las variantes en las posiciones de VP1 de una variante de VJC asociadas con LMP también se denominan variantes de la invención). En un aspecto, la invención proporciona correlaciones entre el estado mutacional en posiciones predeterminadas de una variante de VJC y el riesgo de LMP. En algunas realizaciones, las variantes están ubicadas en la proteína VJC-VP1.

Tal y como se usa en la presente memoria, "diagnosticar" e "identificar" LMP significa el reconocimiento de si una persona presenta riesgo de LMP o tiene LMP. El diagnóstico de presentar riesgo de LMP no se limita a la determinación de variantes en posiciones indicativas de exposición a una variante de VJC y puede combinarse con métodos de diagnóstico rutinarios en la técnica. Estos ensayos de diagnóstico incluyen, pero no están limitados a, histopatología, inmunohistoquímica, citometría de flujo, citología, ensayos patofisiológicos, incluyendo MRI y tomografía, ensayos neurológicos, ensayos bioquímicos. La detección de ADN de VJC por PCR en LCR es el ensayo de diagnóstico de LMP más aceptado. Tiene una especificidad del 99 % y una selectividad del 70 %. En ausencia de un resultado positivo de la PCR de VJC para LCR, se podría realizar una biopsia de cerebro. La detección de ADN de VJC en tejido cerebral se puede usar como diagnóstico positivo de LMP. Los ensayos bioquímicos incluyen, pero no están limitados a, análisis de variantes distintas de las de en posiciones predeterminadas, análisis del genoma viral, análisis ELISA de proteínas específicas, recuento de plaquetas, etc. Los expertos en la técnica serán conscientes de numerosos protocolos y parámetros de diagnóstico que se utilizan rutinariamente en la técnica.

El diagnóstico también abarca una determinación de la cantidad de variante de VJC (carga viral) y la relación de variante de VJC frente a VJC de tipo salvaje en una muestra y/o sujeto.

Los métodos y/o kits de la invención pueden usarse para cribar sujetos que tengan LMP y presenten riesgo de LMP, como lo indica la presencia de variantes en posiciones predeterminadas indicativas de exposición a una variante de VJC (las variantes de la invención), en la que la presencia de una o más variantes de la invención está asociada con presentar riesgo de LMP. Los métodos de la invención pueden usarse para diagnosticar el riesgo de LMP evaluando las variantes de la invención en una muestra de un sujeto que ha estado expuesto o se sospecha que ha estado expuesto a una variante de VJC asociada con LMP.

La invención, en algunos aspectos, incluye varios ensayos para determinar si un sujeto ha estado expuesto a una variante de VJC que tiene una o más variantes en posiciones específicas en la proteína VP1. Los métodos y ensayos de la invención pueden usarse para monitorizar los cambios en el estado de las variantes de la invención en una muestra y/o un sujeto a lo largo del tiempo. Además, los métodos de la invención pueden usarse para monitorizar la cantidad de variante de VJC presente en el sujeto a lo largo del tiempo, obteniendo múltiples muestras del sujeto en diferentes puntos de tiempo. Por lo tanto, los métodos de la invención pueden usarse para examinar cambios en las variantes de la invención y/o la cantidad de variante de VJC en un sujeto o muestra a lo largo del tiempo. Esto permite la monitorización del estado mutacional en un sujeto que se sospecha que presenta riesgo de desarrollar LMP y también permite la monitorización cuantitativa en un sujeto que se sabe que ha estado expuesto a una variante de VJC.

Detección de anticuerpos, polipéptidos y ácidos nucleicos de variantes de VJC-VP1

En un aspecto, la invención proporciona métodos para la detección de polipéptidos y/o anticuerpos de variantes de VJC-VP1 que pueden unirse específicamente a los polipéptidos de variantes de VJC en una muestra biológica (también denominados polipéptidos y anticuerpos de la invención, respectivamente). Los métodos para detectar polipéptidos y anticuerpos son bien conocidos en la técnica y la invención no se limita a ningún método de detección específico. Además, los polipéptidos y anticuerpos pueden detectarse indirectamente, mediante la detección de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos o anticuerpos de la invención. Los métodos para la detección de ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica y los ejemplos no limitantes son PCR, secuenciación, análisis de hibridación, análisis de sonda y análisis de micromatrices, todos los cuales están englobados por la presente invención. Los ejemplos no limitantes de métodos para la detección de polipéptidos y/o anticuerpos incluyen secuenciación de péptidos, espectrometría de masa y ensayos inmunoabsorbentes (p. ej., unión del polipéptido a un anticuerpo) y matrices de proteínas.

Los ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) son ensayos bien conocidos usados para la detección de varios antígenos, incluyendo polipéptidos. La invención engloba cualquier ELISA que pueda detectar la presencia de un polipéptido de la invención y cualquier ELISA que pueda detectar la presencia de anticuerpos de la invención en una muestra.

En una realización, una primera etapa de un ELISA comprende proporcionar un anticuerpo primario específico para un polipéptido VJC-VP1 unido a una placa de pocillos múltiples. La invención no se limita a placas de pocillos múltiples y los anticuerpos pueden inmovilizarse sobre cualquier superficie, incluyendo perlas y portaobjetos de vidrio. La invención tampoco se limita a anticuerpos y la invención engloba cualquier resto de unión de péptidos, incluyendo aptámeros, fragmentos de anticuerpos y moléculas pequeñas. La invención engloba tanto la determinación cualitativa como cuantitativa de la presencia de polipéptidos de la invención. En una realización, los pocillos se pueden bloquear usando un tampón que contenga una alta concentración de proteína irrelevante, tal como albúmina de suero bovino o caseína. La etapa de bloqueo asegura que cualquier área no recubierta de la superficie esté ocupada con proteína no reactiva, si es necesario. A continuación, se elimina el exceso de agente bloqueante mediante uno o más lavados. En algunas realizaciones, el ELISA es un ensayo multiplex y cada pocillo de una placa de pocillos múltiples comprende un anticuerpo específico para una variante de polipéptido VJC-VP1 específica. Una vez que la superficie está bloqueada, una muestra que contiene un polipéptido VJC-VP1, o una muestra que se va a ensayar para determinar la presencia de un polipéptido VJC-VP1, se puede poner en contacto con el anticuerpo primario y se deja incubar en condiciones y durante un periodo de tiempo adecuados para permitir la unión específica del polipéptido VJC-VP1 al anticuerpo primario. Dichas condiciones y cantidad de tiempo pueden ser, por ejemplo, temperatura ambiente durante 3-4 horas o 4 °C durante 10-16 horas. A continuación, se elimina el exceso de muestra mediante uno o más lavados. Como siguiente etapa, un anticuerpo secundario, también específico para el polipéptido VJC-VP1, se pone en contacto con el complejo anticuerpo primario-polipéptido y se deja incubar en condiciones y durante un periodo de tiempo adecuados para permitir la unión específica del polipéptido VJC-VP1 por el anticuerpo secundario. Dichas condiciones y cantidad de tiempo pueden ser, por ejemplo, anticuerpo a 1-10 microgramos/ml, temperatura ambiente durante 1-4 horas y 4 °C durante 10-16 horas. En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario se conecta a una etiqueta fluorescente o a una enzima metabolizadora, lo que permite la detección del polipéptido VJC-VP1 unido. Alternativamente, el polipéptido VJC-VP1 unido se puede determinar poniendo en contacto el anticuerpo secundario con un anticuerpo terciario marcado. El ELISA descrito anteriormente se denomina ELISA en sándwich ya que el polipéptido VJC-VP1 se intercala en forma de sándwich entre dos anticuerpos (el anticuerpo primario y el anticuerpo secundario).

En algunas realizaciones, se determina la presencia de anticuerpos específicos para polipéptidos VJC-VP1. La invención engloba la determinación tanto cualitativa como cuantitativa de la presencia de anticuerpos de la invención. La determinación de la presencia de anticuerpos puede permitir la determinación tanto de una infección actual como pasada. En la mayoría de los casos, el cuerpo humano desarrollará un anticuerpo frente a un polipéptido extraño, tal como las proteínas de VJC. Incluso si el virus (p. ej., ácido nucleico viral) en sí mismo ya no se detecta en el cuerpo, los anticuerpos frente al virus aún pueden estar presentes, siendo así un indicador de exposición al virus. En una realización de un método para detectar anticuerpos específicos para polipéptidos de VJC-VP1 variantes, se proporcionan una o más superficies sólidas (p. ej., una placa de pocillos múltiples, una perla o un portaobjetos) en donde cada superficie tiene una variante de polipéptido de VJC-VP1 única inmovilizada.

En algunas realizaciones, las variantes del polipéptido VJC-VP1 se inmovilizan como partículas de VJC (p. ej., proteínas VP1 recombinantes que contienen una o más variantes y que se autoensamblan para formar partículas que están inmovilizadas, por ejemplo, en una superficie de ensayo). Estas partículas pueden contener una o más de las variantes descritas en la presente memoria (véanse, p. ej., las Tablas 1A-1H, la Tabla 17 y/o la Tabla 18, y/o una o más de las otras variantes descritas en la presente memoria).

Cada variante de polipéptido comprende una o más de las variantes de las Tablas 1A-1H, Tabla 17 y/o Tabla 18 y/o una o más de las otras variantes descritas en la presente memoria. Múltiples péptidos pueden abarcar la misma una o más variantes. En una realización, las combinaciones de variantes de polipéptidos se unen a la superficie sólida. En algunas realizaciones, la superficie sólida se proporciona como una placa de pocillos múltiples en donde cada pocillo comprende una o más variantes. En algunas realizaciones, una placa de múltiples pocillos comprende pocillos con péptidos que abarcan todas las variantes descritas en la presente memoria que son indicativas de riesgo de LMP. Una muestra que comprende o se sospecha que comprende uno o más anticuerpos que pueden unirse a una variante de polipéptido VJC-VP1 descrita en la presente memoria se pone en contacto con los péptidos inmovilizados en condiciones adecuadas para que los anticuerpos se unan al polipéptido VJC-VP1 inmovilizado. La presencia de los anticuerpos unidos se detecta posteriormente mediante la unión de un anticuerpo secundario.

Los ELISA de la invención no se limitan a las realizaciones descritas anteriormente, sino que también engloban ELISA competitivos y cualquier forma de ELISA que permita la detección de los polipéptidos y anticuerpos de la invención.

Inicio, progresión, regresión

Los métodos y/o kits de la invención se pueden usar para obtener información de pronóstico útil proporcionando un indicador temprano del inicio, progresión y/o regresión de la LMP. La invención incluye métodos para monitorizar el inicio, progresión o regresión de la LMP y/o infección por variante de VJC en un sujeto, por ejemplo, obteniendo muestras en momentos secuenciales de un sujeto y ensayando dichas muestras para determinar la exposición a variantes de VJC de la invención. Se puede sospechar que un sujeto tiene LMP o se puede creer que no tiene LMP y, en el último caso, la muestra puede servir como un nivel de línea base normal para comparar con las muestras posteriores.

El inicio de una afección es el inicio de los cambios asociados con la afección en un sujeto. Dichos cambios pueden evidenciarse por síntomas fisiológicos. Sin embargo, un paciente puede ser clínicamente asintomático. Por ejemplo, el inicio de la LMP y/o infección por VJC puede ir seguido de un período durante el cual puede haber cambios patogénicos asociados con LMP en el sujeto, aunque los síntomas clínicos pueden no ser evidentes en ese momento.

La progresión de la LMP sigue al inicio y es el avance de los elementos patogénicos (p. ej., fisiológicos) de la afección, que pueden estar marcados o no por un aumento de los síntomas clínicos. Por el contrario, la regresión de la LMP y/o infección por VJC puede incluir una disminución de las características fisiológicas de la afección, quizás con una reducción paralela de los síntomas, y puede ser el resultado de un tratamiento o puede ser una reversión natural de la afección. El inicio de la LMP y/o infección por VJC puede estar indicado por un cambio en las variantes en las posiciones examinadas en muestras obtenidas del sujeto. Por ejemplo, si el número de variantes en las posiciones examinadas es menor en una primera muestra de un sujeto que en una segunda muestra o una muestra posterior del sujeto, esto puede indicar el inicio o progresión de la LMP y/o infección por VJC. En algunas realizaciones, la presencia de solo una variante puede ser indicativa del inicio o progresión de la LMP. En algunas realizaciones, la variante está en la posición 164. En una realización particular, la aparición de un aminoácido variante (p. ej., Lys) en la posición 164 es indicativa del inicio o progresión de LMP. En algunas realizaciones, el inicio de la LMP y/o infección por VJC está indicado por un cambio en la carga viral de la variante de VJC y/o la relación de la variante de VJC con respecto al tipo salvaje de VJC. En algunas realizaciones, un aumento de la carga viral se acompaña de un aumento del número de variantes.

La progresión y regresión de la LMP y/o infección por VJC puede indicarse generalmente por el aumento o disminución del número de variantes en las posiciones examinadas en las muestras de un sujeto a lo largo del tiempo. Por ejemplo, si el número de variantes es bajo en una primera muestra de un sujeto y se determina que están presentes niveles aumentados de variantes en una segunda muestra o en una muestra posterior del sujeto, puede indicar la progresión de la LMP y/o infección por VJC, respectivamente. Debe apreciarse que tanto un aumento como una disminución en el número de variantes pueden ser indicativos de progresión o regresión de la LMP y/o infección por VJC, respectivamente. Por ejemplo, el número de variantes en determinadas posiciones puede aumentar, mientras que el número de variantes en otras posiciones puede disminuir, siendo ambos cambios indicativos de LMP y/o infección por VJC.

La progresión de la LMP y/o infección por VJC también puede estar indicada por el aumento de la carga viral de una variante de VJC o un aumento en la relación de la variante de VJC con respecto al tipo salvaje de VJC, mientras que la regresión puede estar indicada por una disminución en la carga viral de una variante de VJC o una disminución en la relación de la variante de VJC con respecto al tipo salvaje de VJC.

El inicio, progresión y regresión se pueden determinar ensayando múltiples muestras que se obtienen de un sujeto en diferentes puntos de tiempo. Por ejemplo, incluso si un primer grupo de muestras tomadas en diferentes puntos de tiempo no muestra el inicio, progresión o regresión de la LMP, se puede obtener y ensayar una muestra adicional para determinar las variantes de la invención y comparar con muestras anteriores para determinar si se está produciendo el inicio, progresión o regresión. En algunas realizaciones, se ensayan muestras adicionales cuando se modifican los regímenes de administración de uno o más inmunosupresores.

Ensayos para el tratamiento de la LMP

Los métodos de la invención también se pueden usar para evaluar la eficacia de un tratamiento terapéutico de LMP mediante el examen de la exposición a una variante del virus JC en un sujeto en varios puntos de tiempo. Por ejemplo, el número de variantes indicativo de exposición a un virus JC variante puede obtenerse antes del inicio de un régimen terapéutico (ya sea profiláctico o como tratamiento del cáncer o una afección precancerosa), durante el régimen de tratamiento y/o después de un régimen de tratamiento, proporcionando así información sobre la eficacia del régimen en el sujeto. Además, la abundancia de las variantes de VJC indicativa de riesgo de LMP también se puede monitorizar a lo largo del tiempo. En algunas realizaciones, la cantidad de variante de VJC (carga viral) o la relación de variante de VJC con respecto a VJC de tipo salvaje puede proporcionar información sobre la eficacia del régimen en el sujeto. Los métodos de la invención pueden usarse para comparar las posiciones mutadas en dos o más muestras obtenidas de un sujeto en diferentes momentos. En algunas realizaciones, se obtiene una muestra de un sujeto, se administra al sujeto un tratamiento para la LMP y se obtiene una muestra posterior del sujeto. Se determina una comparación de las variantes de la invención de un sujeto o la carga viral de la variante de JC o la relación de la variante de JC con respecto al tipo salvaje de VJC en muestras obtenidas en diferentes momentos y/o en diferentes días, proporcionando así una medida del estado de la LMP del sujeto, que puede usarse para determinar la eficacia de cualquier tratamiento para LMP y/o infección por VJC en un sujeto.

Tal y como se usa en la presente memoria, el tratamiento de la LMP engloba tanto el tratamiento profiláctico como el terapéutico, y engloba tanto la prevención como el tratamiento de la LMP. Un sujeto puede recibir tratamiento para la LMP porque se ha determinado que el sujeto presenta riesgo de LMP o, alternativamente, el sujeto puede tener LMP. Por lo tanto, un tratamiento puede reducir o eliminar por completo la LMP y/o la infección por VJC o evitar que empeore. "Evaluación del tratamiento", tal y como se usa en la presente memoria, significa la comparación de los niveles de variantes de un sujeto indicativos de la exposición a una variante de VJC o la carga viral de la variante de VJC en muestras obtenidas del sujeto en diferentes momentos de muestreo, por ejemplo, con una separación de al menos un día. En algunas realizaciones, el tiempo para obtener la segunda muestra del sujeto es de al menos 5, 10, 20, 30, 40,

50 minutos después de obtener la primera muestra del sujeto. En determinadas realizaciones, el tiempo para obtener la segunda muestra del sujeto es al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 36, 48, 72, 96, 120 o más horas después de obtener la primera muestra del sujeto. En algunas realizaciones, el tiempo para obtener la segunda muestra del sujeto es al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 60, 90, 120, 150, 180, 360 o más días después de obtener la primera muestra del sujeto.

Tratamiento de la LMP

En una realización, un agente terapéutico para el tratamiento de la LMP es un agente antiinfeccioso. Un agente terapéutico puede ser un agente antiinfeccioso que trata una infección microbiana, p. ej., un agente terapéutico que es eficaz para tratar una infección del SNC. En algunas realizaciones, un agente antiinfeccioso puede ser un ARNsi. Sin embargo, pueden usarse otros agentes antiinfecciosos adecuados. Los agentes antiinfecciosos pueden ser agentes antimicrobianos tales como los agentes antivirales. Los agentes antivirales se pueden combinar con agentes antiinfecciosos adicionales tales como agentes antifúngicos o agentes antibacterianos. Los agentes terapéuticos pueden ser moléculas o compuestos naturales o sintéticos. Un agente terapéutico útil en métodos y composiciones puede ser un polipéptido, compuesto químico, molécula pequeña, lípido, ácido nucleico u otro compuesto.

Los ejemplos de ácidos nucleicos que pueden usarse como agentes terapéuticos (p. ej., agentes antiinfecciosos) en métodos y composiciones son moléculas pequeñas de ARN de interferencia (ARNsi), ADN antisentido, ARN antisentido o aptámeros que pueden usarse para prevenir y/o tratar una enfermedad o trastorno del SNC, incluyendo la LMP. Un "ARN de interferencia pequeño" o "ARNsi", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula de ARN que puede derivarse de la escisión sucesiva de un ARN bicatenario (ARNds) dentro de una célula para producir una molécula de ARN. Un ARNsi eficaz generalmente tiene una longitud de entre 15 y 30 nucleótidos, y más a menudo entre 20 y 25 nucleótidos. Los ARNsi funcionan para dirigir la destrucción de las dianas de ARNm correspondientes durante la interferencia de ARN en animales. Se describe la administración de moléculas de ARNsi para tratar una enfermedad o trastorno del SNC (p. ej., una infección del SNC) asociado con un virus JC variante. En algunos aspectos, los métodos de la invención pueden incluir la administración a un sujeto de una composición terapéutica que incluye un ARNsi y/o un ARNsi precursor como tratamiento de una enfermedad o afección del SNC. Una molécula de ARNsi precursora es una molécula de ARN bicatenaria que después de la administración puede reducirse de tamaño, por ejemplo, mediante la enzima Dicer, para formar el ARNsi pretendido, volviéndose funcional para el tratamiento con ARNsi de una enfermedad o afección del SNC. Por lo tanto, los métodos pueden incluir la administración de un ARNsi o una molécula de ARNsi precursora para tratar una enfermedad o afección del SNC.

Selección del tratamiento

En algunas realizaciones, los métodos de la invención pueden usarse para ayudar a seleccionar un tratamiento para un sujeto con LMP o que presenta riesgo de LMP. La selección de un tratamiento para la LMP puede basarse en la determinación de las variantes indicativas de exposición a una variante de VJC. La selección del tratamiento también puede basarse en la cantidad de variante de VJC en una muestra (carga viral) o en la relación de VJC variante con respecto a VJC de tipo salvaje. Los métodos para seleccionar un tratamiento pueden ser útiles para evaluar y/o ajustar el tratamiento de los sujetos que ya reciben un fármaco o una terapia para la LMP. Tomando como base las variantes encontradas que son indicativas de exposición a una variante de VJC, puede ser apropiado alterar un régimen terapéutico para un sujeto. Por ejemplo, la detección de un cambio en una o más de las posiciones indicativas de exposición a una variante de VJC en un sujeto que ha recibido o está recibiendo tratamiento para LMP o VJC puede indicar que el régimen de tratamiento debe ajustarse (p. ej., la dosis o la frecuencia de la dosificación, aumento, inicio de un nuevo tratamiento, etc.). En algunas realizaciones, el cambio en la carga viral de una variante de VJC o la relación de VJC variante respecto a VJC de tipo salvaje puede indicar que el régimen de tratamiento debe ajustarse. En algunas realizaciones, un sujeto puede estar libre de cualquier tratamiento presente para la LMP y/o infección por VJC y la monitorización de variantes en posiciones indicativas de exposición a la variante de VJC y/o la carga viral de la variante de VJC y/o la relación de variante de VJC respecto al tipo salvaje de VJC puede identificar al sujeto como un candidato para un tratamiento para la LMP y/o la infección por VJC. Por lo tanto, los sujetos pueden ser seleccionados y tratados con niveles elevados de los mismos fármacos o con diferentes terapias como resultado de ensayos para detectar indicios de exposición a una variante de VJC y/o una carga viral de la variante de VJC y/o una relación de la variante de VJC con respecto al tipo salvaje VJC.

Según la presente invención, algunos sujetos pueden estar libres de síntomas que de otro modo requieren tratamiento con una terapia particular y la detección de indicios de exposición a una variante de VJC y/o una carga viral de una variante de VJC y/o una relación de variante de VJC con respecto al tipo salvaje de VJC puede identificar que el sujeto necesita tratamiento. Esto significa que en ausencia del uso de los métodos de la invención para identificar indicios de exposición a una variante de VJC y/o una carga viral de una variante de VJC y/o una relación de variante de VJC respecto al tipo salvaje de VJC, el sujeto no tendría síntomas según convención en la fecha de la presentación de la presente solicitud que requirieran tratamiento con una terapia particular para LMP y/o infección por VJC.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para la decisión sobre regímenes de tratamiento para la LMP. Un médico puede tomar decisiones sobre las opciones de tratamiento, al menos en parte, tomando como base los ensayos de diagnóstico de la invención.

Tratamiento relacionado con inmunosupresores

Los métodos para seleccionar el tratamiento pueden ser útiles para las personas que se están sometiendo a un tratamiento no dirigido a la LMP o infección por VJC, sino dirigido a una afección diferente. En una realización, el tratamiento es un tratamiento que comprende inmunosupresores. En algunas realizaciones, una persona que se sospecha que presenta riesgo de desarrollar LMP es una persona que se está sometiendo a tratamiento con inmunosupresores.

En algunas realizaciones, la detección de un cambio en uno o más indicios de exposición a una variante de VJC en un sujeto que ha recibido o está recibiendo un tratamiento no dirigido a LMP puede indicar que el régimen de tratamiento debe ajustarse. En algunas realizaciones, la detección de un cambio en uno o más indicios de exposición a una variante de VJC en un sujeto que ha recibido o está recibiendo tratamiento con inmunosupresores puede indicar que el régimen de tratamiento debe ajustarse. En algunas realizaciones, la detección de un cambio en la carga viral de una variante de VJC o la relación de variante de VJC con respecto al tipo salvaje en un sujeto que ha recibido o está recibiendo tratamiento con inmunosupresores puede indicar que el régimen de tratamiento debe ajustarse. En algunas realizaciones, la detección de un cambio de secuencia en una o más posiciones de VP1 predeterminadas de un VJC en un sujeto que ha recibido o está recibiendo tratamiento con inmunosupresores puede indicar que el régimen de tratamiento debe terminarse o interrumpirse. En algunas realizaciones, el agente inmunosupresor es natalizumab. En algunas realizaciones, la detección de un aumento en la carga viral de una variante de VJC y/o la relación de la variante de VJC con respecto al tipo salvaje de VJC en un sujeto que ha recibido o está recibiendo tratamiento con inmunosupresores puede indicar que el régimen de tratamiento debe terminarse o interrumpirse.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para la decisión sobre regímenes de tratamiento. Un médico puede tomar decisiones sobre las opciones de tratamiento, al menos en parte, tomando como base los ensayos de diagnóstico de la invención. En algunas realizaciones, los métodos de la invención proporcionan un ensayo de diagnóstico para decidir sobre un tratamiento adecuado con agentes inmunosupresores. En algunas realizaciones, un médico puede decidir terminar o interrumpir el tratamiento con agentes inmunosupresores tomando como base el resultado de uno o más ensayos de diagnóstico de VJC-VP1 de la invención. En algunas realizaciones, los métodos de la invención proporcionan un ensayo de diagnóstico para el tratamiento de un sujeto, en donde el sujeto está inmunocomprometido. En algunas realizaciones, un médico puede decidir terminar o interrumpir el tratamiento del sujeto inmunocomprometido tomando como base el resultado de los ensayos de diagnóstico de VJC-VP1 de la invención.

Sujetos inmunocomprometidos o sujetos en tratamiento con inmunosupresores

Los ensayos de la invención pueden ser particularmente útiles para sujetos inmunocomprometidos y/o sujetos que están siendo tratados con uno o más inmunosupresores.

En algunos casos, los sujetos pueden recibir tratamiento con uno o más inmunosupresores (también denominados inmuno-supresores) dirigidos a diferentes enfermedades o afecciones, incluyendo uno o más de los siguientes ejemplos no limitativos: cáncer, trasplante de órganos o tejidos, afecciones o enfermedades inflamatorias, esclerosis múltiple (EM), artritis, etc., o cualquier combinación de los mismos.

Los sujetos también pueden estar inmunocomprometidos. Los ejemplos no limitantes de sujetos inmunocomprometidos son sujetos que son positivos para el VIH o que tienen SIDA o linfoma o cualquier otra afección que resulte en una supresión de la respuesta inmune.

El término "agente inmunosupresor" tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a sustancias que actúan para suprimir o enmascarar el sistema inmune de un sujeto que se trata en la presente memoria. Los agentes inmunosupresores pueden ser sustancias que suprimen la producción de citoquinas, regulan a la baja o suprimen la expresión de autoantígenos o enmascaran los antígenos del MHC. Los ejemplos de dichos agentes incluyen pirimidinas sustituidas en 5 con 2-amino-6-arilo (véase, la Pat. de EE. UU. No. 4.665.077); fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE); ganciclovir, tacrolimus, glucocorticoides tales como cortisol o aldosterona, agentes antiinflamatorios tales como inhibidor de ciclooxigenasa, un inhibidor de 5-lipoxigenasa, o un antagonista del receptor de leucotrieno; antagonistas de purina tales como azatioprina o micofenolato mofetil (MMF); agentes alquilantes tales como ciclofosfamida; bromocriptina; danazol; dapsona; glutaraldehído (que enmascara los antígenos de MHC, como se describe en la Pat. de EE. UU. No. 4.120.649); anticuerpos antiidiotípicos para antígenos de MHC y fragmentos de MHC; ciclosporina A; esteroides tales como corticosteroides o glucocorticosteroides o análogos de glucocorticoides, p. ej., prednisona, metilprednisolona, y dexametasona; inhibidores de la dihidrofolato reductasa tales como metotrexato (oral o subcutáneo); hidroxicloroquina; sulfasalazina; leflunomida; antagonistas de citoquinas o del receptor de citoquinas incluyendo anticuerpos antiinterferón alfa, beta, o gamma, anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral alfa (infliximab o adalimumab), inmunoadhesina anti-TNF-alfa (etanercept), anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral beta, anticuerpos anti-interleuquina-2 y anticuerpos anti-receptor de IL-2; anticuerpos anti-LFA-1, incluyendo anticuerpos anti-CD11a y anti-CD18; anticuerpos anti-CD20 (p.ej., rituximab, por ejemplo, disponible con la marca registrada RITUXAN); anticuerpos anti-L3T4; anticuerpos anti-VLA-4 (p. ej., natalizumab, por ejemplo, disponible con la marca registrada TYSABRI); globulina antilinfocitos heteróloga; anticuerpos generales para T, por ejemplo, anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4/CD4a; péptido soluble que contiene un dominio de unión a LFA-3 (WO 90/08187

publicada el 26 de julio, 1990); estreptoquinasa; TGF-beta; estreptodornasa; ARN o ADN del huésped; FK506; RS-61443; desoxiespergualina; rapamicina; receptor de células T (Cohen et al., Pat. de EE. UU. No. 5.114.721); fragmentos del receptor de células T (Offner et al., Science, 251: 430432 (1991); WO 90/11294; laneway, Nature, 341: 482 (1989); y WO 91/01133); y anticuerpos del receptor de células T (EP 340.109) tales como T10B9. Sin embargo, los sujetos que reciben otros agentes inmunosupresores pueden seleccionarse para ensayos de diagnóstico y/o ser tratados, ya que la invención no está limitada a este respecto.

Cribado de agentes terapéuticos candidatos

También se describen métodos para el cribado de agentes terapéuticos candidatos o estrategias para prevenir y/o tratar la LMP y/o infección por VJC. La evaluación de la eficacia de los agentes y estrategias terapéuticos candidatos puede realizarse usando ensayos de la invención en sujetos (p. ej., animales no humanos) y en células de cultivo. En algunas realizaciones, un agente terapéutico candidato puede ser un compuesto o molécula que puede interactuar con un polipéptido que comprende una o más variantes de VJC-VP1 asociadas con LMP. En algunas realizaciones, un agente terapéutico candidato puede ser un compuesto o molécula que puede cambiar el patrón y el número de variantes de VJC-VP1 en un sujeto que tiene una infección por VJC. En algunas realizaciones, un terapéutico candidato es un agente que puede reducir la cantidad de variante de VJC (carga viral) en una muestra o sujeto. En algunas realizaciones, un terapéutico candidato es un agente que puede reducir la relación de VJC variante con respecto a VJC de tipo salvaje. En algunas realizaciones, un terapéutico candidato es un agente (p. ej., una molécula pequeña) que mimetiza el receptor de VJC y puede competir por la unión de VJC. En algunas realizaciones, la administración al sujeto de un agente, o la exposición de una muestra al agente candidato o al tratamiento candidato, dará como resultado un cambio en el patrón de variantes de VJC-VP1 asociadas con una infección por VJC en un sujeto. En algunas realizaciones, la administración al sujeto de un agente, o la exposición de una muestra al agente candidato o al tratamiento candidato, dará como resultado un cambio en el número de variantes de VJC-VP1 asociadas con LMP en una infección por VJC. En algunas realizaciones, la administración al sujeto de un agente, o la exposición de una muestra al agente candidato o al tratamiento candidato, dará como resultado una disminución de la carga viral de la variante de VJC y/o la relación de variante de VJC con respecto al tipo salvaje de VJC.

En una realización, una muestra que comprende células que expresan una variante de VJC se expone a un agente terapéutico o tratamiento candidato. Una muestra que comprende células expuestas al candidato, que no expresan la variante de VJC, funcionará como control. El nivel de expresión de la variante de VJC (carga viral) se monitoriza tras la administración del terapéutico o tratamiento candidato, y el cambio en la expresión de la variante de VJC se compara con muestras que no se trataron con el agente terapéutico candidato. Si el nivel de carga viral de la variante VJC de la invención en la muestra que ha sido expuesta al agente ha cambiado en comparación con la muestra de control, el agente es un terapéutico candidato o un tratamiento candidato. En algunas realizaciones, las variantes de VJC se expresan y secretan de células y se someten a contacto con un agente candidato. Cualquier agente candidato que pueda unirse a la variante de VJC es un agente terapéutico candidato. En algunas realizaciones, el agente terapéutico candidato se une a un polipéptido VP1 de la variante de VJC.

También se describen métodos para identificar agentes terapéuticos candidatos que suprimen el número o nivel de variantes de VP1 asociadas a LMP en una infección por VJC y que suprimen el riesgo de LMP. En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos candidatos están dirigidos a una enfermedad o afección que no es una LMP o infección por VJC. En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos candidatos son inmunosupresores. En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos candidatos son agentes que se prescriben en terapia inmunosupresora.

También se describen métodos de cribado de agentes o tratamientos que modulan los niveles de expresión de variantes de VJC. Los métodos de cribado pueden incluir mezclar el agente candidato con células o tejidos o en un sujeto o exponer células o tejidos o un sujeto al tratamiento candidato y usar métodos para ensayar la carga viral de las variantes de VJC para determinar el nivel de expresión antes y después del contacto con el agente o tratamiento candidato. Una disminución en la cantidad de expresión de la variante de VJC en comparación con un control es indicativa de que el agente o tratamiento candidato es capaz de tratar la LMP y/o la infección por VJC en una célula, tejido y/o sujeto.

En algunas realizaciones, una mezcla de ensayo para ensayar un agente candidato comprende un agente candidato. Un agente candidato puede ser un anticuerpo, un pequeño compuesto orgánico o un polipéptido y, por consiguiente, puede seleccionarse de bibliotecas de anticuerpos combinatorias, bibliotecas de proteínas combinatorias o bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas. Típicamente, se ejecutan una pluralidad de mezclas de reacción en paralelo con diferentes concentraciones de agente para obtener una respuesta diferente a las diversas concentraciones. Típicamente, una de esas concentraciones sirve como un control negativo, p. ej., a concentración cero de agente o a una concentración de agente por debajo de los límites de detección del ensayo.

Cualquier molécula o compuesto puede ser un terapéutico candidato. Los ejemplos no limitantes de terapéuticos candidatos son moléculas pequeñas, ARN que incluye ARNs, ADN que incluye aptámeros y proteínas que incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. La invención también engloba terapéuticos candidatos con diferentes modos de acción.

Los agentes candidatos engloban numerosas clases químicas, aunque típicamente son compuestos orgánicos, proteínas o anticuerpos (y fragmentos de los mismos que se unen al antígeno). En algunas realizaciones, los agentes candidatos son pequeños compuestos orgánicos, p. ej., aquellos que tienen un peso molecular de más de 50 pero menos de aproximadamente 2.500, por ejemplo, menos de aproximadamente 1.000 y, en determinadas realizaciones, menos de aproximadamente 500. Los agentes candidatos comprenden grupos químicos funcionales necesarios para las interacciones estructurales con polipéptidos y/o ácidos nucleicos, y pueden incluir al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, opcionalmente al menos dos de los grupos químicos funcionales o al menos tres de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos pueden comprender carbono cíclico o estructuras heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales identificados anteriormente. Los agentes candidatos pueden ser también biomoléculas tales como ácidos nucleicos, polipéptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, isoprenoides, purinas, pirimidinas, derivados o análogos estructurales de los anteriores, o combinaciones de los mismos y similares.

Los agentes candidatos se obtienen de una amplia variedad de fuentes, incluyendo bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, están disponibles numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo la expresión de oligonucleótidos aleatorios, bibliotecas combinatorias orgánicas sintéticas, bibliotecas de presentación en fagos de polipéptidos aleatorios o no aleatorios, bibliotecas combinatorias de proteínas o anticuerpos y similares. Alternativamente, las bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales están disponibles o se producen fácilmente. Además, las bibliotecas y los compuestos naturales y producidos de forma sintética se pueden modificar fácilmente mediante medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales. Además, los agentes conocidos pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc., para producir análogos estructurales de los agentes.

También se puede incluir en la mezcla una variedad de otros reactivos. Estos incluyen reactivos tales como sales, tampones, proteínas neutras (p. ej., albúmina), detergentes, etc., que pueden usarse para facilitar una unión óptima proteína-proteína y/o proteína-agente. Dicho reactivo puede reducir también las interacciones no específicas o de fondo de los componentes de la reacción. También se pueden usar otros reactivos que mejoran la eficacia del ensayo, tales como inhibidores de proteasas, inhibidores de nucleasas, agentes antimicrobianos y similares.

Kits

En algunos aspectos se proporcionan kits. Los kits de la invención pueden contener ácido nucleico, polipéptidos, anticuerpos u otras moléculas de la invención para su uso en diagnóstico *in vitro*, pronóstico, monitorización de la LMP y/o infección por VJC, exposición a variantes de VJC y/o ensayo de agentes terapéuticos candidatos. Los componentes de los kits pueden envasarse en medios acuosos o en forma liofilizada. Los reactivos para su uso en ensayos de PCR y ELISA también pueden incluirse en los kits de la invención, al igual que los agentes de marcaje detectables en forma de intermedios o como restos separados para conjugarlos como parte de los procedimientos para ensayar el riesgo de LMP, infección por VJC o exposición a una variante de VJC. En algunas realizaciones de un kit de la invención, el kit puede incluir instrucciones para determinar la presencia de las variantes de la invención y/o para determinar la carga viral de una variante de VJC. El kit también puede incluir valores de control (p. ej., números de referencia) que se pueden usar para interpretar los resultados de los métodos usados en la invención.

Un kit puede incluir ácido nucleico, anticuerpos o polipéptidos que pueden usarse para identificar uno o más indicios de exposición a variantes de VJC que tienen una o más variantes de VP1 asociadas a LMP. En algunas realizaciones, los kits incluyen materiales para su uso en técnicas estándar de ELISA para identificar anticuerpos que pueden unirse a uno o más polipéptidos que comprenden una o más variantes indicativas de exposición a una variante de VJC. En algunas realizaciones, un kit de la invención puede incluir componentes de ácido nucleico para unirse y detectar ácidos nucleicos que codifican una o más variantes o combinaciones de variantes descritas en la presente memoria como asociadas con LMP. En algunas realizaciones, un kit puede incluir uno o más anticuerpos diferentes que se unen específicamente a uno o más polipéptidos que comprenden una o más variantes o combinaciones de variantes de la invención. Un kit también puede incluir componentes para su uso con los anticuerpos para determinar la expresión de variantes de VJC o la exposición a variantes de VJC en una célula, tejido o sujeto.

Un kit puede comprender un vehículo que se compartimenta para recibir en un confinamiento cerrado en el mismo uno o más medios de contenedor o una serie de medios de contenedor tales como tubos de ensayo, viales, matraces, botellas, jeringas o similares. El kit también puede contener una muestra de control. En algunas realizaciones, el kit comprende instrucciones para interpretar los resultados del ensayo, tales como instrucciones para determinar si un ensayo indica si el nivel de un agente detectado en el ensayo se correlaciona con la exposición a una infección por VJC (p. ej., por un VJC de tipo salvaje o variante).

Muestras biológicas

Los métodos para ensayar la exposición a una variante de VJC se pueden llevar a cabo en cualquier muestra biológica adecuada. En algunas realizaciones, puede obtenerse una muestra de un sujeto y procesarse y analizarse directamente para determinar indicios de VJC como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, las células pueden aislarse de una muestra biológica y crecer en cultivo antes del análisis. Tal y como se usa en la

5 presente memoria, un sujeto puede ser un animal humano o no humano, incluyendo, pero no limitado a, un primate no humano, vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato o roedor. Los métodos de la invención pueden usarse para ensayar la exposición a una variante de VJC en sujetos que aún no han sido diagnosticados con LMP. Los métodos de la invención pueden usarse para ensayar la exposición a una variante de VJC en sujetos que aún no han sido diagnosticados como infectados por VJC. Además, los métodos de la invención pueden aplicarse a sujetos que han sido diagnosticados con LMP y/o infección por una variante de VJC. Una muestra puede comprender una o más células. Una muestra puede provenir directamente de un sujeto o de un cultivo celular. Una muestra puede procesarse (p. ej., para preparar un lisado celular) o procesarse parcialmente antes de su uso en los métodos de la invención. En algunas realizaciones, se puede procesar una muestra de un sujeto o cultivo para obtener ácidos nucleicos o polipéptidos para su uso en ensayos para detectar la exposición a una variante del virus JC como se describe en la presente memoria. Por lo tanto, una etapa inicial en un ensayo puede incluir el aislamiento de una muestra de ácido nucleico genómico y/u otros ácidos nucleicos y/o polipéptidos de una célula, tejido y/u otra muestra. La extracción de ácidos nucleicos y/o polipéptidos puede realizarse por cualquier medio adecuado, incluyendo los métodos de rutina usados por los expertos en la técnica, tales como métodos que incluyen el uso de lisados de detergentes, sonicación y/o agitación con vórtex con perlas de vidrio, etc.

20 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "muestra" significa cualquier material animal que contenga ADN o ARN o proteína, tal como, por ejemplo, tejido o líquido aislado de un individuo (incluyendo, sin limitación, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, orina, linfa, lágrimas, saliva y secciones de tejido) o de constituyentes de cultivos celulares *in vitro*. Una muestra que contiene ácidos nucleicos puede contener ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos ribonucleicos (ARN) o copolímeros de ácidos desoxirribonucleicos y ácidos ribonucleicos o combinaciones de los mismos. Una muestra que contiene polipéptidos puede contener péptidos y/o proteínas. En algunas realizaciones, la muestra contiene anticuerpos. Una muestra puede haber sido sometida a purificación (p. ej., extracción) y/u otro tratamiento. El término "muestra" también puede referirse a una "muestra biológica".

25 Tal y como se usa en la presente memoria, el término "muestra biológica" puede referirse a tejido, células o partes componentes (p. ej., líquidos corporales, incluyendo, pero no limitado a, sangre, mucosa, líquido linfático, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, saliva, líquido amniótico, sangre del cordón amniótico, orina, heces, líquido vaginal, y semen, etc.) de un sujeto. Una "muestra biológica" también puede referirse a un homogenado, lisado o extracto preparado a partir de tejidos, células o partes componentes, o una fracción o parte de los mismos, incluyendo, pero no limitado a, por ejemplo, plasma, suero, líquido espinal, líquido linfático, orina, las secciones externas de la piel, tractos respiratorios, intestinales y urogenitales, lágrimas, saliva, heces, leche, células sanguíneas, tumores, u órganos, biopsias del SNC, etc.

35 Las fuentes de muestra pueden incluir tejidos, incluyendo, pero no limitado a, tejidos linfáticos; líquidos corporales (p. ej., sangre, líquido linfático, etc.), células cultivadas; líneas celulares; portaobjetos histológicos; tejido embebido en parafina; etc. El término "tejido" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a poblaciones de células tanto localizadas como diseminadas incluyendo, pero no limitado a: cerebro, corazón, suero, mama, colon, vejiga, epidermis, piel, útero, próstata, estómago, testículos, ovario, páncreas, glándula pituitaria, glándula suprarrenal, glándula tiroidea, glándula salival, glándula mamaria, riñón, hígado, intestino, bazo, timo, médula ósea, tráquea y pulmón. Los líquidos biológicos incluyen, pero no están limitados a, sangre, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo, lágrimas, saliva, orina y heces, etc. Se pueden usar técnicas invasivas y no invasivas para obtener dichas muestras y están bien documentadas en la técnica. Una muestra de control puede incluir un líquido corporal, una célula, un tejido o un lisado del mismo. En algunas realizaciones, una muestra de control puede ser una muestra de una célula o sujeto que está libre de LMP y/o infección por, o exposición a, una variante de VJC. En algunas realizaciones, una muestra de control puede ser una muestra que proviene de una célula o sujeto que tiene LMP y/o ha estado expuesto a una variante de VJC. En algunas realizaciones, una muestra de control es una muestra que comprende virus JC de tipo salvaje.

45 Vacunas

También se describe una vacuna para inmunizar a un mamífero frente a LMP o infección por una variante de VJC asociada a LMP. Una vacuna puede comprender al menos un polipéptido que comprende una o más secuencias variantes de VJC de la invención. En algunas realizaciones, una vacuna puede incluir uno o más péptidos de VJC variante o de VJC descritos en la presente memoria como se predice para reducir la unión al ácido siálico. En algunas realizaciones, una vacuna puede incluir una pluralidad de péptidos diferentes (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-15, 15-20, 20-50 o más) para proporcionar un amplio rango de epítopos diferentes. En algunas realizaciones, el polipéptido es un polipéptido variante de VJC-VP1 de longitud completa. En otra realización más, el polipéptido es un polipéptido VJC-VP1 de longitud completa seleccionado del grupo que consiste en los polipéptidos descritos en la presente memoria (p. ej., en la FIG. 3 o Tabla 1 o 2B, Tabla 17 y/o Tabla 18, y/o una o más de las otras variantes descritas en la presente memoria), o cualquier fragmento del mismo (p. ej., un polipéptido con una longitud de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 100-150, 150-200 aminoácidos, o un polipéptido más largo, más corto o de longitud intermedia) que tiene al menos un aminoácido variante (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos variantes) en una o más de las posiciones predeterminadas descritas en la presente memoria. En algunas realizaciones, el polipéptido es un fragmento de una proteína VJC-VP1 que comprende uno o más aminoácidos variantes de la invención. También se describe una composición farmacéutica que comprende al menos un polipéptido variante de VJC y un excipiente, diluyente o vehículo adecuado. En algunas realizaciones, un polipéptido en la vacuna tiene una longitud de aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40 o

aproximadamente 50 aminoácidos, o comprende la longitud total de la proteína VJC-VP1. Estas composiciones son adecuadas para prevenir o tratar la LMP y/o una infección por una variante de VJC asociada con la LMP. Una composición farmacéutica puede administrarse a un sujeto en una cantidad efectiva para estimular la producción de una respuesta protectora de anticuerpos o protectora de las células T. En algunas realizaciones, la vacuna es una

5 vacuna de ácido nucleico que comprende ácidos nucleicos que codifican uno o más polipéptidos de VJC variantes de la invención.

El término "inmunizar" se refiere a la capacidad de una sustancia para provocar una respuesta humoral y/o celular en un sujeto, ya sea sola o cuando está unida a un vehículo, en presencia o ausencia de un adyuvante, y también se refiere a una respuesta inmune que bloquea la infectividad, bien parcial o totalmente, de un agente infeccioso. Una

10 "vacuna" de LMP es una composición inmunogénica capaz de provocar protección frente a LMP, ya sea parcial o completa. Una vacuna también puede ser útil para tratar a un sujeto que tiene LMP. Los regímenes de administración de vacunas son conocidos por un experto en la técnica. En algunas realizaciones, los rangos de cantidades de vacunas de polipéptidos para la profilaxis de LMP son de 0,01 a 100 microgramos/dosis, por ejemplo, de 0,1 a 50 microgramos/dosis. Pueden ser necesarias varias dosis por sujeto con el fin de lograr una respuesta inmune suficiente y una protección posterior frente a la LMP o la infección por una variante de VJC asociada con la LMP.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen cualquier vehículo que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son típicamente macromoléculas grandes, de metabolización lenta, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos

20 poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos; y partículas virales inactivas. Dichos vehículos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los adyuvantes para aumentar la eficacia de las vacunas de polipéptidos de la invención incluyen, pero no están limitados a: hidróxido de aluminio (alúmina), N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP) como se encuentra en la Pat. de EE. UU. No. 4.606.918, N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-s-n-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE) y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil lípido A, dimicolato de trehalosa, y esqueleto de pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de escualeno al 2 %/Tween 80. Cualquiera de los tres componentes MPL, TDM o CWS también puede usarse solo o en combinaciones de dos. En algunas realizaciones, uno o más péptidos de la invención pueden usarse para la inmunización usando una o más técnicas descritas en Goldmann et al., 1999, Journal of Virology, vol. 73, No. 5, p 4465-4469.

25

En algunas realizaciones, se puede administrar una vacuna a un sujeto antes de o junto con el inicio de una terapia inmunosupresora, o cualquier otro tratamiento que pueda afectar (p. ej., debilitar) el sistema inmune.

30

Anticuerpos

En determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos para variantes de VJC también están englobados por la invención. Pueden usarse anticuerpos en los ensayos de detección descritos en la presente memoria (p. ej., ensayos ELISA). Los anticuerpos se pueden usar en terapia para tratar a sujetos con LMP y/o para prevenir o reducir la infección por variantes de VJC. Pueden seleccionarse anticuerpos adecuados o fragmentos de los mismos por su capacidad de unirse a uno o más polipéptidos variantes de VJC descritos en la presente memoria. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD, IgE o puede tener un dominio constante y/o variable de inmunoglobulina de una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD o IgE. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico o multiespecífico. En realizaciones adicionales, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico, o una mezcla de estos. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano, p. ej., un anticuerpo monoclonal humano, un anticuerpo policlonal o una mezcla de anticuerpos monoclonales y policlonales. Los fragmentos de unión a antígeno pueden incluir CDR3 de un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, y/o un fragmento Fv.

35
40
45

Se pueden generar anticuerpos frente a una variante de proteína VJC-VP1 de longitud completa o frente a variantes de polipéptidos que comprenden una secuencia parcial de la variante de proteína VJC-VP1. Los anticuerpos se pueden generar inyectando a un animal, por ejemplo, un conejo o una cabra o un ratón, el antígeno (p. ej., un polipéptido de una variante de VJC-VP1).

Con el fin de preparar anticuerpos policlonales, se pueden sintetizar proteínas de fusión que contienen una variante de VJC-VP1 en bacterias mediante la expresión de las secuencias de ADN correspondientes en un vehículo de clonación adecuado. La proteína puede purificarse entonces, acoplarse a una proteína vehicular y mezclarse con adyuvante de Freund (para ayudar a estimular la respuesta antigénica de los conejos) e inyectarse en conejos u otros animales de laboratorio. Alternativamente, los polipéptidos pueden aislarse de células cultivadas que expresan la proteína. Después de las inyecciones de refuerzo a intervalos quincenales, se extrae sangre de los conejos u otros animales de laboratorio y se aíslan los sueros. Los sueros pueden usarse directamente o purificarse antes de su uso, p. ej., mediante métodos tales como cromatografía de afinidad, Proteína A-Sefarosa, Antígeno Sefarosa, Anti-Ig de ratón-Sefarosa. A continuación, los sueros se pueden usar para sondear extractos de proteínas procesados en un gel

50
55

de poliácridamida para identificar los polipéptidos variantes de VJC. Alternativamente, se pueden preparar polipéptidos variantes de VJC sintéticos y usarse para inocular animales.

Para producir anticuerpos de variante de VJC monoclonales, se inyecta a los ratones varias veces (véase más arriba), los bazo de los ratones se extraen y se resuspenden en una disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Las células del bazo sirven como fuente de linfocitos, algunos de los cuales producen anticuerpos de la especificidad apropiada. A continuación, se fusionan con una célula compañera de mieloma en crecimiento permanente, y los productos de la fusión se colocan en placas en varios pocillos de cultivo de tejidos en presencia de un agente selectivo tal como HAT. A continuación, los pocillos se criban mediante ELISA para identificar aquellos que contienen células que expresan anticuerpos útiles. A continuación, estas se siembran en placas. Después de un período de crecimiento, estos pocillos se criban de nuevo para identificar las células productoras de anticuerpos. Se llevan a cabo varios procedimientos de clonación hasta que más del 90 % de los pocillos contienen clones únicos que son positivos para la producción de anticuerpos. A partir de este procedimiento se establece una línea estable de clones para producir el anticuerpo. A continuación, se puede purificar un anticuerpo monoclonal mediante cromatografía de afinidad usando Proteína A Sefarosa, cromatografía de intercambio iónico, así como variaciones y combinaciones de estas técnicas (véase, p. ej., la Patente de EE. UU. 6.998.467).

En algunas realizaciones, los anticuerpos "humanizados" se usan en la terapia en seres humanos. La humanización de anticuerpos implica reemplazar secuencias nativas de ratón con secuencias humanas para reducir la posibilidad de una respuesta inmune una vez que el anticuerpo terapéutico se introduce en seres humanos.

Infecciones del SNC

El poliomavirus JC es un virus que infecta el cerebro y el SNC (sistema nervioso central). Los sujetos que padecen infecciones microbianas del SNC pueden ser susceptibles a una infección por el virus JC variante y/o proliferación en el SNC. Las infecciones microbianas del SNC pueden incluir, pero no están limitadas a, infecciones bacterianas, fúngicas, protozoarias, similares a virus y virales. Las infecciones incluyen afecciones tanto agudas como crónicas. Las infecciones microbianas del SNC ejemplares pueden resultar en un absceso cerebral, meningitis, encefalitis, vasculitis o leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP). La mayoría de las infecciones del SNC que forman abscesos se diseminan por la sangre y están relacionadas con septicemia y endocarditis, aunque puede haber una infección directa que surja de una infección de los senos nasales o del oído medio/mastoides. Las infecciones bacterianas del SNC pueden incluir, pero no están limitadas a, infección por *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacteriaceae*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* o *Listeria monocytogenes*. Las infecciones fúngicas del SNC son menos comunes que las infecciones bacterianas, pero pueden surgir en individuos con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y en otros individuos inmunocomprometidos, tales como los que se someten a quimioterapia o terapia inmunosupresora. Un ejemplo de una infección por protozoos del SNC es la tripanosomiasis neurológica en estadio tardío, o enfermedad del sueño, que está causada por la infección del SNC por protozoos de tripanosoma.

Las infecciones virales del SNC pueden incluir, pero no están limitadas a, meningitis aséptica, encefalitis y leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP). Los síndromes neurológicos agudos asociados con la infección viral incluyen, por ejemplo, encefalitis viral aguda, parálisis flácida, meningitis aséptica y encefalomiелitis posinfecciosa. La encefalitis viral aguda puede estar causada, por ejemplo, por el virus del herpes simple, citomegalovirus, varicela, rabia o un arbovirus. Los agentes virales comunes de la meningitis aséptica incluyen, por ejemplo, enterovirus, virus de las paperas y virus de la coriomeningitis linfocítica. La encefalomiелitis posinfecciosa es una complicación de la infección por sarampión, paperas, rubéola e infección primaria por virus varicela-zóster, por ejemplo. El síndrome de Guillain-Barre también es un síndrome neurológico agudo asociado con una infección viral.

Las enfermedades neurológicas crónicas adicionales atribuibles a una infección viral incluyen, panencefalitis esclerosante subaguda (causada por una infección persistente de sarampión), encefalopatías espongiiformes (enfermedades priónicas) (p. ej., enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), síndrome de Gerstmann-Straussler) y enfermedades retrovirales (p. ej., VIH-1 y VIH-2) caracterizadas por parálisis, emaciación y ataxia.

Por consiguiente, los aspectos de la invención pueden usarse para evaluar el riesgo de LMP en sujetos que tienen uno o más síntomas de una infección microbiana del SNC.

Estudios de variantes de VJC

Tanto la genética del huésped como la viral pueden contribuir a la LMP. Estudios anteriores centrados en factores genéticos virales identificaron duplicaciones y reordenamientos en la región reguladora del genoma viral [Pfister LA, Letvin NL, Koralnik IJ (2001) JC virus regulatory region tandem repeats in plasma and central nervous system isolates correlate with poor clinical outcome in patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Virol* 75: 5672-5676; Major EO, Amemiya K, Tornatore CS, Houff SA, Berger JR (1992) Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clin Microbiol Rev* 5: 49-73; Loeber G, Dorries K (1988) DNA rearrangements in organ-specific variants of polyomavirus JC strain GS. *J Virol* 62: 1730-1735; Martin JD, King DM, Slauch JM, Frisque RJ (1985) Differences in regulatory sequences of

naturally occurring JC virus variants. J Virol 53: 306-311; y Zheng HY, Takasaka T, Noda K, Kanazawa A, Mori H, et al. (2005) New sequence polymorphisms in the outer loops of the JC polyomavirus major capsid protein (VP1) possibly associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. J Gen Virol 86: 2035-2045]. Varios estudios con un número de muestras muy limitado de individuos con LMP y sanos también reportaron resultados conflictivos sobre la posible asociación de varias mutaciones en la proteína VP1 con LMP [Zheng HY, Takasaka T, Noda K, Kanazawa A, Mori H, et al. (2005) New sequence polymorphisms in the outer loops of the JC polyomavirus major capsid protein (VP1) possibly associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. J Gen Virol 86: 2035-2045; Zheng HY, Ikegaya H, Takasaka T, Matsushima-Ohno T, Sakurai M, et al. (2005) Characterization of the VP1 loop mutations widespread among JC polyomavirus isolates associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. Biochem Biophys Res Commun 333: 996-1002; Kato A, Sugimoto C, Zheng HY, Kitamura T, Yogo Y (2000) Lack of disease-specific amino acid changes in the viral proteins of JC virus isolates from the brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. Arch Virol 145: 2173-2182]. No se ha reportado ningún análisis exhaustivo de una asociación de cambios en los genes que codifican proteínas de VJC con LMP. Se mostró que la patogenicidad de virus que van desde el virus de la influenza [Srinivasan A, Viswanathan K, Raman R, Chandrasekaran A, Raguram S, et al. (2008) Quantitative biochemical rationale for differences in transmissibility of 1918 pandemic influenza A viruses. Proc Natl Acad Sci U S A 105: 2800-2805; y Chandrasekaran A, Srinivasan A, Raman R, Viswanathan K, Raguram S, et al. (2008) Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin. Nat Biotechnol 26: 107-113] al poliomavirus de ratón [Bauer PH, Bronson RT, Fung SC, Freund R, Stehle T, et al. (1995) Genetic and structural analysis of a virulence determinant in polyomavirus VP1. J Virol 69: 7925-7931; y Bauer PH, Cui C, Liu WR, Stehle T, Harrison SC, et al. (1999) Discrimination between sialic acid-containing receptors and pseudoreceptors regulates polyomavirus spread in the mouse. J Virol 73: 5826-5832], un pariente cercano del VJC humano, estaba determinada por secuencias de aminoácidos implicadas en la unión de una proteína de la cápside viral a receptores de glicanos sialilados. Los cambios en la afinidad y especificidad del virus por su o sus receptores celulares afectan a la infectividad y transmisión viral, por lo que juegan un papel crucial en la virulencia. Por ejemplo, un estudio del poliomavirus de ratón mostró que los cambios de aminoácidos en VP1 en lugar de los cambios en la región reguladora no codificante son los responsables del aumento de la patogenicidad del virus.

Los aspectos de la invención se ilustran mediante experimentos relacionados con la proteína VP1 y su relación con la LMP. Se usaron métodos de evolución molecular para determinar la presencia de supuestos cambios adaptativos en la secuencia de aminoácidos de VP1 asociados con LMP. La ventaja de este enfoque sobre la asociación estadística simple de variantes de secuencia con la enfermedad es que tiene en cuenta la relación filogenética de las cepas virales y también permite la identificación de posiciones de aminoácidos funcionalmente significativas mediante el examen de la tasa de evolución de las secuencias.

Según aspectos de la invención, un virus que alberga sustituciones es adecuadamente infeccioso si es suficientemente abundante en el SNC de pacientes con LMP para ser aislado. En algunas realizaciones, se predice que los cambios en la especificidad de los glicanos permitirán que VJC pierda su especificidad por los glicanos sialilados expresados fuera del SNC (p. ej., RBC). Por lo tanto, dicho virus evitaría quedar atrapado en "pseudorreceptores" en la periferia y viajaría sin obstáculos desde los sitios de diseminación viral para entrar en el cerebro. El virus mutado aún debe mantener su especificidad por los glicanos expresados en los oligodendrocitos. Esto es consistente con la observación del modelo de poliomavirus de ratón donde una mutación en una posición ortóloga a la posición 269 de VJC afectó la capacidad viral para unirse a los RBC y también condujo a un aumento dramático en la diseminación viral a través del animal con un resultado letal [Dubensky TW, Freund R, Dawe CJ, Benjamin TL (1991) Polyomavirus replication in mice: influences of VP1 type and route of inoculation. J Virol 65: 342-349; y Freund R, Garcea RL, Sahli R, Benjamin TL (1991) A single-amino-acid substitution in polyomavirus VP1 correlates with plaque size and hemagglutination behavior. J Virol 65: 350-355]. Además, hay varios informes de la detección de VJC en las amígdalas de muchos individuos infectados asintóticamente [Kato A, Kitamura T, Takasaka T, Tominaga T, Ishikawa A, et al. (2004) Detection of the archetypal regulatory region of JC virus from the tonsil tissue of patients with tonsillitis and tonsillar hypertrophy. J Neurovirol 10: 244-249; y Monaco MC, Jensen PN, Hou J, Durham LC, Major EO (1998) Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: evidence for site of initial viral infection. J Virol 72: 9918-9923.]. Aunque esta observación se tomó como apoyo para la infección por VJC de las células de las amígdalas, también podría explicarse por el atrapamiento viral en los tejidos linfoides. Esto es consistente con la unión de VJC al ácido siálico en el tejido de las amígdalas [Eash S, Tavares R, Stopa EG, Robbins SH, Brossay L, et al. (2004) Differential distribution of the JC virus receptor-type sialic acid in normal human tissues. Am J Pathol 164: 419-428].

Según la invención, dado el gran número de mutaciones que son específicas de la LMP, es probable que más de un mecanismo (p. ej., dos o más mecanismos) pueda desempeñar un papel en la etiología de la LMP en diferentes casos de LMP. Según algunos aspectos de la invención, las mutaciones de VP1 asociadas a LMP pueden aumentar el tropismo de VJC para las células de la sustancia blanca del cerebro, lo que conduce a una mayor infectividad y replicación viral en los oligodendrocitos. Según otros aspectos de la invención, las mutaciones en LMP pueden permitir el escape inmune del virus. Fuera de la respuesta inmune policlonal dirigida frente a la molécula de VP1, solo un número limitado de anticuerpos dirigidos frente al sitio de unión al receptor celular (ácido siálico) puede proporcionar protección frente a la diseminación de la infección viral. La mutación de un aminoácido en un epítipo crucial para la inmunidad protectora puede permitir que el virus se una a sus células diana y se disemine sin inhibiciones.

Los experimentos descritos en la presente memoria abordan cómo ocurren determinadas mutaciones en la LMP y por qué, a pesar de una prevalencia muy alta de VJC, solo una pequeña proporción de pacientes inmunodeficientes

desarrollan LMP. Según aspectos de la invención, la ausencia de agrupamiento de las mutaciones en el árbol filogenético viral sugiere que surgen de forma independiente en pacientes individuales en lugar de persistir en las poblaciones generales como variantes virales patógenas. Según aspectos de la invención, y tomando como base los experimentos descritos en la presente memoria, las mutaciones de *VP1* desempeñan un papel muy significativo en el mecanismo de aparición de la LMP. Una vez que ocurre una mutación específica que afecta la unión al ácido siálico, esto permite que el virus se disemine al cerebro e infecte a los oligodendrocitos. El hecho de que el virus mutante no se haya detectado en el riñón sugiere que ese cambio particular en la unión de glicanos no ofrece ninguna ventaja selectiva al virus mutado en el riñón. Las mutaciones podrían haber ocurrido y, por lo tanto, permitido que el virus estableciera su residencia en el cerebro en condiciones de inmunosupresión poco o mucho antes de la LMP. Dado que no se detectó replicación viral en cerebros de individuos asintomáticos, es poco probable que la evolución compartimentalizada (p. ej., Intra SNC) antes del desarrollo de la LMP pueda explicar la presencia de *VP1* mutada en el SNC de pacientes con LMP. Sin embargo, la cuestión de la latencia de VJC en el cerebro normal sigue siendo controvertida, por lo que todavía es posible formalmente que un virus no mutado haya entrado en el cerebro y que las mutaciones hayan surgido en el cerebro y no en la periferia, p. ej., en el riñón.

Según aspectos de la invención, el sistema inmune sano controla eficazmente la activación viral en el cerebro. Sin embargo, tan pronto como falla el sistema inmune en determinados individuos que albergan dicho virus mutado, el virus comienza a proliferar activamente en los oligodendrocitos causando LMP. También es posible que un sistema inmune sano pueda suprimir eficazmente mutantes recién desarrollados en su sitio periférico (p. ej., riñón) y evitar que se diseminen e infecten nuevas células diana. Por lo tanto, el momento del desarrollo de la LMP puede estar limitado por mutaciones y la interacción con factores genéticos ambientales o del huésped puede contribuir al desarrollo no determinista de la LMP. Además, el desarrollo de la LMP puede controlarse mediante interacciones de mutaciones de *VP1* con alteraciones genéticas adicionales del virus, incluyendo la reordenación de la región reguladora viral, ya que podría dar al virus una ventaja selectiva adicional para aumentar la replicación viral en los oligodendrocitos.

Según aspectos de la invención, y como se ilustra en los Ejemplos descritos en la presente memoria, las mutaciones en *VP1* de VJC que afectan a su especificidad de receptor pueden ser responsables de la patología de la LMP. Estos resultados brindan oportunidades para el descubrimiento de nuevos compuestos terapéuticos anti-poliomavirus y el diagnóstico de enfermedades causadas por estos virus. El papel preciso que desempeñan estas mutaciones en la etiología de la LMP, así como cómo y dónde surgen, requiere una investigación más extensa que implicaría el análisis de la secuencia de *VP1* de muestras longitudinales y coincidentes en el tiempo de diferentes órganos (p. ej., orina, sangre, LCR) y de una variedad de pacientes con LMP.

El estudio de las secuencias de *VP1* de muestras secuenciales, como se describe en la presente memoria, mostró la persistencia de las mismas cepas virales a lo largo del curso de la enfermedad. Dado que el virus mutado representó la población prevalente o única y que se mantuvo a lo largo del tiempo, parece ser necesario y suficiente para la propagación de la infección. De forma notable, se adquirieron sustituciones adicionales en caso de recidiva en un paciente que sobrevivió al primer episodio de LMP. Esta observación sugiere, en primer lugar, que el antiguo virus mutado sobrevive eficazmente, ya sea en el SNC o en la periferia, y, en segundo lugar, que la aparición de una nueva sustitución puede desencadenar un nuevo episodio de LMP. En algunas realizaciones, un virus recién mutado puede surgir en un contexto de activación del virus bajo un control inmune subóptimo y una vez que surge, es posible que el sistema inmune no lo reconozca rápidamente.

En algunas realizaciones, los aspectos de la invención se refieren a la identidad de las secuencias de *VP1* en plasma y LCR en pacientes con LMP. Parece que tanto el virus aislado de plasma como el aislado de LCR son igualmente distintos del virus aislado de orina, incluso si la mutación se excluyó del análisis. Esto indica que las poblaciones de LCR y plasma no surgieron independientemente de la orina, sino que una de estas poblaciones se originó a partir de la misma fuente que la población de orina y la otra se originó a partir de la primera. Aunque no se observaron secuencias de *VP1* que portaran mutaciones responsables de LMP en la orina de pacientes con LMP, es posible que una mutación que se adquirió originalmente durante la replicación viral en el riñón no haya recibido ninguna ventaja competitiva sobre el virus residente no mutante para convertirse en dominante o incluso una población detectable en el sitio del riñón. Esto es consistente con la observación de que las VLP preparadas a partir de la mayoría de las moléculas de *VP1* mutantes han perdido la capacidad de unirse a las células epiteliales de los túbulos renales, el sitio de la infección viral en el riñón.

Según los aspectos de la invención, sin pretender la vinculación a ninguna teoría, cuando una mutación hace que un virus pierda su especificidad por uno o más receptores que contienen ácido siálico que se encuentran ampliamente, es más probable que el virus mutante (en la circulación sanguínea), respecto a un virus de tipo salvaje, escape de ser atrapado por una multitud de pseudorreceptores de oligosacáridos que contienen sialo expresados en una gran mayoría de células en la periferia. Por consiguiente, es más probable que el virus mutante llegue al cerebro, o al menos a la barrera hematoencefálica (BBB). Una vez que el virus logra sortear los obstáculos periféricos y alcanza la BBB, todavía tiene que cruzar la capa de células endoteliales para llegar al SNC. En algunas realizaciones, la aparición extremadamente rara de LMP, incluso en pacientes con inmunosupresión significativa, puede deberse a la constelación temporal requerida de eventos raros independientemente tales como la aparición de una determinada partícula de virus mutante y la presencia de una abertura en la BBB.

La hipótesis de que las mutaciones en la proteína VP1 contribuyen a la progresión de la LMP al aumentar las posibilidades de que el virus escape de la circulación periférica para entrar en el SNC es consistente con la observación de que ~ 10 % de todos los casos de LMP contengan virus no mutado. Por lo tanto, incluso un virus no mutante también podría entrar en el SNC dado un alto nivel de viremia que podría abrumar la defensa periférica de los pseudorreceptores virales y también dada la apertura temporalmente coincidente en la BBB. Sin embargo, una vez que un virus entra en el cerebro, puede que no haya diferencia entre el virus mutante y no mutante en su capacidad para infectar oligodendrocitos y diseminarse en el SNC, lo que sería consistente con la capacidad retenida de las VLP mutantes para unirse a astrocitos derivados del SNC, otra diana de VJC durante una infección cerebral en curso. Alternativamente, la mutación de VP1 podría haber surgido durante la replicación viral en el SNC al volverse dominante en el LCR porque proporcionó alguna ventaja competitiva para que el virus se diseminara por el cerebro. Dado que en la mayoría de las muestras analizadas todos o > 95 % de todos los clones aislados tenían que contener mutaciones con el fin de que la última hipótesis fuera cierta, las mutaciones deben tener lugar muy temprano durante la replicación viral en el cerebro. Dado que el virus sin mutaciones en VP1 puede infectar células del SNC con bastante éxito, las mutaciones no proporcionarían una ventaja competitiva a través de la ganancia del tropismo viral hacia las células del SNC, aunque podrían haberlo mejorado. Aún así, no se puede excluir formalmente la posibilidad de que al menos en algunos casos el virus entre en el cerebro en forma no mutada y adquiera la mutación durante su activación dentro del SNC bajo la condición de inmunosupresión en un paciente.

Independientemente del sitio de selección, las sustituciones de VP1 de VJC parecen ser clave para el potencial de producción de LMP viral. Las proteínas de la cápside y la cubierta viral son críticas para mediar la unión viral a las células diana virales y la infectividad. Por lo tanto, las mutaciones en la proteína HA de la gripe permiten que el virus cambie su especificidad sutil para la unión al ácido siálico y la capacidad del virus para cambiar de la infectividad zootrópica a la humana. De manera similar, se mostró que algunas de estas mutaciones están asociadas con una mayor virulencia de la gripe en la población humana, como lo subraya el ejemplo de la gripe de 1918 al cambiar la especificidad del ácido siálico expresado preferentemente en las células de la parte superior de los lóbulos pulmonares a las expresadas en la parte inferior del pulmón. Otro mecanismo por el cual un virus podría ganar un aumento en virulencia es probablemente al perder su amplia especificidad de receptor, lo que hace que el virus quede atrapado en células que no infecta de manera productiva. Uno de los ejemplos mejor estudiados de dicho mecanismo proviene de los estudios de otro poliomavirus, la infección por poliomavirus murino en ratones. En este modelo, se demostró que una mutación en la posición 296, que es estructuralmente ortóloga a la posición 269 crítica para la producción de LMP por VJC, cambió dramáticamente la especificidad viral para los ácidos siálicos y afectó la capacidad viral para unirse a las células diana y a los RBC y también condujo al aumento dramático de la diseminación viral a través del animal dando lugar a un resultado letal. Por lo tanto, parece que un cambio en la proteína de la cubierta viral que afecta la unión viral a su receptor es un mecanismo extremadamente común que desempeña un papel crucial en la alteración de la virulencia y patogénesis viral, sin exceptuar a los poliomavirus humanos.

En algunos aspectos, se detectan las mutaciones en las posiciones 55 y 269 a fenilalanina en una muestra de un sujeto. En otros aspectos, al menos estas mutaciones se detectan e indican que el sujeto parece ser el más común, lo que sugiere que estos 2 sitios están bajo una fuerte presión selectiva y proporcionan al virus JC la mayor ventaja para causar LMP. Esta observación se correlaciona fuertemente con la capacidad de mutaciones en estos dos sitios para anular la unión viral a células periféricas y oligosacáridos que contienen ácido siálico, lo que sugiere que esa pérdida de función particular es más ventajosa para el virus para ser seleccionadas positivamente con más frecuencia que otras mutaciones. Como se describe con más detalle en otro lugar de la presente memoria, cada uno de estos sitios representa el 25 % de todas las mutaciones en el presente estudio, siendo las posiciones 267, 265 y 60 las que presentan la siguiente frecuencia más alta, cada una con el 7,5 % de todos los casos. De forma interesante, las muestras de LCR de varios pacientes contenían dos o más poblaciones virales diferentes, cada una con su propia mutación específica de LMP, sin que ningún virus contuviera dos de estas mutaciones simultáneamente. Por consiguiente, algunos aspectos de esta invención proporcionan que pueden surgir varias mutaciones diferentes de forma independiente durante la replicación viral normal y todas podrían ser seleccionadas si cada una proporcionara al virus la ventaja competitiva sobre el virus no mutado. En tres casos, o ~ 10 % de todos los casos de este estudio, no se pudieron encontrar sustituciones asociadas a LMP en el LCR y/o el plasma. Otros cambios genéticos del genoma de VJC, p. ej., que implican mutaciones en las proteínas de la cápside viral menores VP2 o VP3, también podrían plantearse como hipótesis en estos casos para explicar la presencia de estos virus en asociación con LMP.

Los siguientes Ejemplos ilustran de forma adicional la presente invención, pero no se deberían considerarse de forma alguna como limitantes.

Ejemplos

55 Ejemplo 1: detección de variantes de VJC por PCR

Los ácidos nucleicos se aíslan de una muestra biológica usando protocolos establecidos (p. ej., lisis celular). Debido a que el ADN viral puede haberse integrado en el ADN genómico o aún puede estar presente como una entidad más pequeña, tanto el ADN genómico como las secuencias de ADN más cortas se aíslan y se someten a análisis por PCR. Tras el aislamiento, los ácidos nucleicos se resuspenden en un tampón que facilitará el análisis por PCR. Los expertos en la técnica conocen tampones que facilitan el análisis por PCR (p. ej., Maniatis) y también están disponibles comercialmente de los fabricantes de enzimas de PCR (p. ej., New England Biolabs, Beverly, MA). Los cebadores de

nucleótidos están diseñados para producir la amplificación del gen VJC-VP1. La amplificación por PCR es una técnica de laboratorio establecida y comprende la adición de cebadores de nucleótidos, una polimerasa y nucleótidos individuales, y tampón de polimerasa y someter esta mezcla a ciclos de hibridación, amplificación y disociación que dan como resultado la amplificación de una secuencia de ADN deseada. Tras la amplificación, el gen de VJC-VP1 se separa del ADN residual y del exceso de nucleótidos individuales. El ADN de VJC-VP1 amplificado se secuencía y la secuencia de nucleótidos resultante se traduce en una secuencia peptídica. Esta secuencia peptídica se compara posteriormente con los paneles de variantes para determinar qué variantes del polipéptido VJC-VP1 están presentes en la muestra biológica.

Ejemplo 2: detección de variantes de VJC usando ELISA

Las proteínas y los péptidos se aíslan de una muestra biológica usando técnicas estándar de laboratorio (p. ej., Maniatis). Tanto las proteínas celulares como las proteínas de componentes no celulares se someten al análisis. En un ensayo, la muestra se examina para determinar la presencia de polipéptidos VJC-VP1 que comprenden una o más variantes de la invención. Los polipéptidos se detectan usando ELISA en sándwich que comprende anticuerpos específicos para polipéptidos VJC-VP1 de la invención. Los anticuerpos se generan inoculando animales (p. ej., conejos) con los polipéptidos VJC-VP1 de la invención dando lugar a anticuerpos policlonales. Si se desea, se pueden recoger células del animal inoculado para generar anticuerpos monoclonales. Los métodos para la generación de anticuerpos tanto policlonales como monoclonales son rutinarios en la técnica. Los anticuerpos frente a las variantes del polipéptido VJC-VP1 se inmovilizan en una superficie sólida (p. ej., una placa de 96 pocillos), con un tipo de anticuerpo por pocillo o área superficial. Las muestras biológicas que comprenden los polipéptidos se añaden a los pocillos y se incuban con los anticuerpos inmovilizados. Cualquier variante de polipéptido VJC-VP1 presente en la muestra se unirá a un anticuerpo específico para el polipéptido. Después de la incubación, se retira la muestra y se lavan las superficies sólidas para eliminar cualquier material no unido. Como siguiente etapa, se añade a los pocillos una disolución que contiene anticuerpos adicionales específicos para péptidos VJC-VP1. Esta segunda parte alícuota de anticuerpos creará el "sándwich" (p. ej., anticuerpo inmovilizado: polipéptido VJC-VP1: segundo anticuerpo). Este segundo anticuerpo puede detectarse usando, por ejemplo, un anticuerpo terciario marcado, lo que permite la detección de polipéptidos variantes de VJC-VP1. Alternativamente, el propio anticuerpo secundario puede estar marcado.

En un segundo ensayo ELISA, las muestras biológicas se ensayan para determinar la presencia de anticuerpos frente a uno o más de los polipéptidos variantes de VJC-VP1. Este ensayo se puede usar para determinar si un sujeto está actualmente infectado con, o ha estado expuesto previamente a, una variante de VJC-VP1. Incluso si la variante de VJC-VP1 ya no está presente, los anticuerpos frente a la variante aún pueden estar presentes en la muestra biológica y pueden detectarse. En este ensayo ELISA, los polipéptidos VJC-VP1 se unen a una superficie sólida y las muestras biológicas se incuban con estos polipéptidos. Si están presentes anticuerpos específicos para estos polipéptidos en las muestras biológicas, se unirán a los polipéptidos. Cualquier material no unido se elimina de nuevo. La presencia de anticuerpo unido se detecta usando un anticuerpo secundario marcado.

Ejemplo 3: determinación de la composición del área superficial accesible al disolvente de la proteína VP1

Los cálculos del área superficial accesible requieren el conocimiento de las coordenadas 3D de la biomolécula. Se construyó un modelo de homología de partícula similar al virus VP1 VJC usando la estructura de CoA1 de la partícula similar al virus SV40 como molde (ID de PDB: 1 SVA). Se usó el algoritmo MODELER (A. Sali y T.L. Blundell. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. J. Mol. Biol. 234, 779-815, 1993) para la construcción de modelos y se usó el enfoque SCWRL3 (A. A. Canutescu, A. A. Shelenkov, y R. L. Dunbrack, Jr. A graph theory algorithm for protein side-chain prediction. Protein Science 12, 2001-2014 (2003)) para el refinamiento de la posición de la cadena lateral. Las áreas superficiales accesibles a disolventes polares y no polares de las cadenas laterales de aminoácidos se calcularon usando el método de Lee y Richards (B. Lee B y F.M. Richards. The Interpretation of Protein Structures: Estimation of Static Accessibility. J. Mol. Biol 55, 379-400 (1971)). Posteriormente, se construyeron modelos 3D de partículas similares a virus de variantes de VP1 de VJC, y posteriormente se calcularon las áreas superficiales accesibles a disolventes polares y no polares de sus cadenas laterales. La diferencia en el área superficial polar con respecto a la variante se calculó restando las áreas superficiales accesibles al disolvente polar de la secuencia consenso de las áreas superficiales accesibles al disolvente polar de la variante en base a la cadena lateral de aminoácidos. La diferencia en el área superficial no polar sobre la variante se calculó restando las áreas superficiales accesibles al disolvente no polar de la secuencia consenso de las áreas superficiales accesibles al disolvente no polar de la variante en base a la cadena lateral de aminoácidos. Los resultados del cálculo se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3.

Variante	Ganancia en AS no Polar	Ganancia en AS Polar
L55->F55	14,12	0
K60->M60	27,35	-13,22

Variante	Ganancia en AS no Polar	Ganancia en AS Polar
K60->N60	-10,18	-3,54
K60->E60	-5,55	-2,1
S61->L61	49,72	-9,78
D66->H66	25,86	-7,95
D66->N66	15,35	-23,4
E69->D69	-6,01	-27,12
N74->S74	-0,12	-30,62
K75->R75	1,43	11,83
N265->D265	-4,55	8,23
N265->T265	11,51	-12,15
S267->F267	92,2	-33,04
S267->L267	85,2	-31,3
S269->F269	75,44	-15,91
S269->Y269	52,69	21
Q271->H271	6,96	6,11

Ejemplo 4: análisis de secuencia de secuencias de VJC

La LMP es una enfermedad desmielinizante progresiva y sobre todo mortal causada por la infección por el virus JC y la destrucción de los oligodendrocitos infectados en múltiples focos cerebrales de individuos susceptibles. Si bien el virus JC tiene una alta prevalencia en la población humana, la LMP es una enfermedad rara que afecta exclusivamente solo a un pequeño porcentaje de individuos inmunocomprometidos, incluyendo los afectados por el VIH (SIDA) o fármacos inmunosupresores. Para explicar la gran discrepancia entre la prevalencia viral y la baja incidencia de la enfermedad, deben estar en juego factores específicos virales y/o del huésped y no simplemente el estado inmune. Según la invención, varios aminoácidos de la superficie de la proteína de la cápside VP1 del virus JC presentan una evolución acelerada en secuencias virales aisladas de pacientes con LMP, pero no en secuencias aisladas de sujetos sanos. Los ejemplos descritos en la presente memoria proporcionan una fuerte evidencia de que al menos algunas de estas mutaciones están implicadas en la unión del ácido siálico, un receptor conocido del virus JC. Se usaron métodos estadísticos de evolución molecular para realizar un análisis completo de las secuencias de VP1 del virus JC aisladas de 55 pacientes con LMP y 253 secuencias aisladas de la orina de individuos sanos y se encontró que un subconjunto de aminoácidos que se encuentran exclusivamente entre las secuencias de VP1 de la LMP se adquiere mediante evolución adaptativa. El modelado de la estructura 3D de la cápside del virus JC mostró que estos residuos están ubicados dentro del sitio de unión del ácido siálico, un receptor del virus JC para la infección celular. La implicación de algunos de estos sitios en la unión del receptor se demostró al mostrar una profunda reducción en las propiedades de hemaglutinación de partículas similares a viral hechas de la proteína VP1 que porta estas mutaciones. En conjunto, estos resultados indican que un fenotipo del virus JC causante de LMP más virulento se adquiere a través de la evolución adaptativa que cambia la especificidad viral por su o sus receptores celulares.

Métodos:

Se descargaron de Genbank 35 secuencias de *VP1* de longitud completa de virus JC aislados de pacientes con LMP y 253 secuencias de *VP1* de longitud completa de virus JC aislados de sujetos sanos. Además, 20 secuencias parciales de *VP1* estaban disponibles en Genbank, lo que permitió el análisis del total de 55 secuencias para las posiciones 43-287. Además de estas 55 secuencias de *VP1* aisladas de pacientes con LMP, la **Tabla 4** también contiene información de doce secuencias parciales más, disponibles en una publicación de Sala et al. [Sala M, Vartanian JP, Kousignian P, Delfraissy JF, Taoufik Y, et al. (2001) Progressive multifocal leukoencephalopathy in human immunodeficiency virus type 1-infected patients: absence of correlation between JC virus neurovirulence and polymorphisms in the transcriptional control region and the major capsid protein loci. *J Gen Virol* 82: 899-907.]. Debe indicarse en estos ejemplos que todas las muestras virales aisladas de pacientes con LMP se originaron en tejidos del cerebro o del LCR, excepto una muestra aislada del riñón (Tabla 4). Todas las muestras virales aisladas de sujetos sanos se originaron en orina. Se construyeron múltiples alineamientos de secuencias usando T-Coffee [Notredame C, Higgins DG, Heringa J (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment *J Mol Biol* 302: 205-217]. Se aislaron varias secuencias de LMP del mismo individuo. Al estudiar la evolución de las secuencias

virales, se aceptaron para el análisis las secuencias aisladas del mismo paciente siempre que difirieran entre sí en ≥ 1 nucleótido. Sin embargo, se excluyeron del análisis secuencias "clonales" idénticas. Esto dio como resultado el conjunto final de 28 secuencias de VP1 de longitud completa y 42 secuencias de VP1 parciales aisladas de pacientes con LMP. Toda la información sobre el origen y la clonalidad de las secuencias se encuentra en la Tabla 4. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el método PhyML de máxima verosimilitud [Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst Biol 52: 696-704] con modelo de sustitución F84 [Kishino H, Hasegawa M (1989) Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in hominoidea. J Mol Evol 29: 170-179 y Felsenstein J, Churchill GA (1996) A Hidden Markov Model approach to variation among sites in rate of evolution. Mol Biol Evol 13: 93-104.] y usando varios métodos incluidos en el paquete PHYLIP (Felsenstein, J. 2005. PHYLIP versión 3.6. Distribuido por el autor. Department of Genome Sciences, Universidad de Washington, Seattle). Las secuencias de VP1 aisladas de pacientes con LMP y los subconjuntos aleatorios de secuencias aisladas de sujetos sanos se analizaron adicionalmente usando PAML [Yang Z (1997) PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. Comput Appl Biosci 13: 555-556]. Se estudiaron múltiples modelos de evolución de secuencia (M0-M8). Se usó un ensayo de razón de verosimilitud para evaluar la diferencia entre los modelos M1 y M2 para ensayar la selección positiva. Los residuos con probabilidades posteriores de Bayes Empíricas de Bayes que superan 0,5 en el análisis del conjunto bien de longitud completa o parcial se reportan en la Tabla 5. Se usó Spidermonkey [Poon AF, Lewis FI, Frost SD, Kosakovsky Pond SL (2008) Spidermonkey: rapid detection of co-evolving sites using Bayesian graphical models. Bioinformatics 24: 1949-1950] para analizar la interacción epistática. Spidermonkey se ejecutó a través del servidor de red Datamonkey [Pond SL, Frost SD (2005) Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. Bioinformatics 21: 2531-2533].

Tabla 4.

Secuencias de VP1 de VJC de pacientes sin LMP:							
BAC66394, BAC66418, BAC66382, BAB11716, BAB11722, AAK28466, AAK28460, AAK28478, BAC66400, BAC66388, BAD06126, BAC66406, AAK97970, AAK97964, BAC81952, BAC81958, AAM89309, AAM89303, BAC81922, BAC81916, BAC81910, BAC81904, AAM89297, BAD11896, BAC81946, BAE45426, BAE45360, BAD06120, BAE45432, BAA01962, BAE45420, BAE45414, BAE45384, BAE45378, BAE45372, AAK98036, BAE45402, BAE45408, BAE45396, BAE45444, BAD06024, BAE75838, BAE75832, BAE75826, BAE75820, BAE75814, AAK98030, AAK98024, AAK98018, AAK98010, AAK98006, AAK98000, BAE45438, BAE45390, BAD06108, BAD06102, BAD06096, BAD06090, BAD06084, BAD06048, BAD06030, BAD06018, BAD06054, BAD06042, BAD06036, AAG30857, BAE45366, AAN85455, BAD06150, AAN85449, AAK98042, BAD06174, BAD06156, BAD06072, BAD06060, AAN85473, BAC81840, BAF40841, BAF40835, BAF40829, BAF40823, BAF40811, BAF40847,							
BAF40781, BAF40817, BAF40799, BAF40793, BAF40787, BAF40745, AAN85467, AAN85461, BAC81834, BAF40751, BAF40805, BAA01961, BAD98972, BAD98966, BAD06227, BAC66430, BAC66412, BAD91887, BAD21235, BAD27118, BAC66424, BAA01958, BAB11710, BAD21265, BAD21259, BAD21253, BAD21241, BAD21229, BAD21247, BAD21283, BAD21271, BAD21295, BAD21289, BAA01959, BAA01960, BAD11848, BAD11842, AAM89339, AAM89327, BAD11836, BAC81852, BAC81858, BAD06144, AAG37198, AAM89315, BAD06138, BAD11890, BAD11884, BAD11878, BAD11872, BAD11866, AAK97994, BAB11698, BAC81940, BAC81964, AAK97946, BAD06066, BAF40769, BAC81870, BAC81864, BAC81934, BAC66376, BAC81874, BAC81846, AAK97940, BAC81898, BAC81892, AAK97922, AAK97916, AAK97910, AAK97982, BAF40763, BAD06078, AAK97958, BAD11860, BAF40757, BAD06162, AAM89321, BAD11854, AAK97928, BAD11830, BAF40775, BAB11704, BAC81928, AAK97988, BAD11902, BAD11824, BAD06233, BAC81886, BAC81880, AAM89345, BAD06168, AAM89333, BAD06132, BAC82365, AAK97952, BAA01964, BAA01963, AAK97934, BAD06114, AAK97976, BAD21277, AAR13077, BAE02908, AAR12957, AAR02463, AAR02457, BAE03058, AAR89235, BAE02896, AAR89241, BAE02890, BAE03064, BAE03070, BAE03082, AAG34673, AAG34667, AAR89205, AAR89217, AAR13659, BAE03088, BAE03160, AAQ88264, AAR89187, AAR89283, AAK28472, AAR06661, AAR89253, AAR89247, AAR89199, AAR89193, AAR89229, AAR89223, AAR89265, AAR32743, AAR89277, BAE03166, BAE02920, BAE02914, BAE03112, BAE03106, BAE03100, BAE03094, BAE03076, BAE02944, BAE02998, BAE02992, BAE02986, BAE02980, BAE02974, BAE02968, BAE02962, BAE03016, BAE02902, BAE03040, AAR89211, AAR89271, BAE02956, BAE02938, BAE02932, BAE03148, BAE02950, BAE03004, BAE03154, BAE03142, BAE03136, BAE03130, BAE03124, BAE03118, BAE02926.							
N	No. de acceso de ADN	No. de acceso de proteína	Fuente de ADN	Nombre del aislado	Longitud de AA	AA de inicio	No. de paciente
1	AF015537	AAB94036	cerebro	601	354	1	1

ES 2 842 425 T3

2	AB183539	BAE00111	cerebro	1-1	354	1	2
3	AB183540	BAE00117	cerebro	1-2	354	1	2
4	AB183541	BAE00123	cerebro	1-3	354	1	2
5	AB183542	BAE00129	cerebro	2-1	354	1	3
6	AB183543	BAE00135	cerebro	2-2	354	1	3
7	AB183544	BAE00141	cerebro	2-3	354	1	3
8	AB190449	BAE00147	cerebro	3-1	354	1	4
9	AB190453	BAE00171	cerebro	3-5	354	1	4
10	AB190452	BAE00165	cerebro	3-4	354	1	4
11	AB190451	BAE00159	cerebro	3-3	354	1	4
12	AB190450	BAE00153	cerebro	3-2	354	1	4
13	AY536239	AAT09819	LCR	SA21_01	354	1	5
N	No. de acceso de ADN	No. de acceso de proteína	Fuente de ADN	Nombre del aislado	Longitud de AA	AA de inicio	No. de paciente
14	AB212952	BAE94726	cerebro	ac-1	354	1	6
15	AB212953	BAE94732	cerebro	ac-2	354	1	7
16	D26589	BAA05636	cerebro	Aic-1a	354	1	8
17	AF004349	AAB62680	riñón	GS/K	354	1	9
18	AF004350	AAB62687	cerebro	GS/B	354	1	9
19	D11365	BAA01967	cerebro	Her1-Br	354	1	10
20	AB214923	BAE02848	LCR	JVL-10	245	39	11
21	AB214924	BAE02849	LCR	JVL-11	245	39	12
22	AB214925	BAE02850	LCR	JVL-12	245	39	13
23	AB214926	BAE02851	LCR	JVL-13	245	39	14
24	AB214927	BAE02852	LCR	JVL-16	245	39	15
25	AB214928	BAE02853	LCR	JVL-17	245	39	16
26	AB214929	BAE02854	LCR	JVL-18	245	39	17
27	AB214930	BAE02855	LCR	JVL-19	245	39	18
28	AB214912	BAE02837	cerebro	JVL-1a	245	39	19
29	AB214913	BAE02838	cerebro	JVL-1b	245	39	19
30	AB214914	BAE02839	cerebro	JVL-1c	245	39	19
31	AB214915	BAE02840	cerebro	JVL-1d	245	39	19
32	AB214916	BAE02841	cerebro	JVL-2	245	39	20
33	AB214931	BAE02856	LCR	JVL-20	245	39	21
34	AB214917	BAE02842	cerebro	JVL-3	245	39	22
35	BAE02843	BAE02843	cerebro	JVL-4	245	39	23

ES 2 842 425 T3

36	AB214919	BAE02844	cerebro	JVL-5	245	39	24
37	AB214920	BAE02845	cerebro	JVL-7	245	39	25
38	AB214921	BAE02846	cerebro	JVL-8	245	39	26
39	AB214922	BAE02847	cerebro	JVL-9	245	39	27
40	J02226	AAA82101	cerebro	Mad-1	354	1	28
41	D11364	BAA01966	cerebro	Mad11-Br	354	1	29
42	D11363	BAA01965	cerebro	Mad8-Br	354	1	30
43	D11366	BAA01968	cerebro	NY-1B	354	1	31
44	AB212954	BAE94738	cerebro	oh-1	354	1	32
45	AY536243	AAT09843	LCR	SA27_03	354	1	33
46	AY536242	AAT09837	LCR	SA28_03	354	1	34
47	AY536241	AAT09831	LCR	SA296_0	354	1	35
N	No. de acceso de ADN	No. de acceso de proteína	Fuente de ADN	Nombre del aislado	Longitud de AA	AA de inicio	No. de paciente
48	AY536240	AAT09825	LCR	SA84_00	354	1	36
49	D11367	BAA01969	cerebro	Sap-1	354	1	37
50	D26590	BAA05637	cerebro	Tky-1	354	1	38
51	AB038254	BAB11728	cerebro	Tky-1	354	1	39
52	AB038255	BAB11734	cerebro	Tky-2a	354	1	40
53	D26591	BAA05638	cerebro	Tky-2a	354	1	41
54	D11368	BAA01970	cerebro	Tokyo-1	354	1	42
55	AF030085	AAC40846	cerebro	Tokyo-1?	354	1	43
56	U21840	AAB60586	cerebro		133	219	44
57	U21839	AAB60584	cerebro		133	219	45
58	NA	NA	LCR	P9VP1	136	11	46
59	NA	NA	LCR	P8VP1	136	11	47
60	NA	NA	LCR	P7VP1	136	11	48
61	NA	NA	LCR	P5VP1	136	11	49
62	NA	NA	LCR	P4VP1	136	11	50
63	NA	NA	LCR	P2VP1	136	11	51
64	NA	NA	LCR	P1VP1	136	11	52
65	NA	NA	LCR	P12VP1	136	11	53
66	NA	NA	LCR	P11VP174	136	11	54
67	NA	NA	LCR	P11VP173	136	11	54
68	NA	NA	LCR	P11VP172	136	11	54
69	NA	NA	LCR	P10VP1	136	11	55

Resultados:

Las secuencias del gen *VP1* de VJC se descargaron de GenBank (**Tabla 4**) y se usaron para construir un árbol filogenético para un subconjunto aleatorio de secuencias aisladas de individuos sanos y de secuencias de longitud completa aisladas de distintos pacientes con LMP (**FIG. 4a**). La FIG. 4 es una distribución filogenética de virus asociados a LMP. (A) Amplia distribución filogenética de virus JC que causan LMP. Se indican las ramas de los árboles (marcadas con números GI) correspondientes a los virus que causan LMP y los virus aislados de sujetos sanos. El árbol se construye tomando como base secuencias de ADN del gen *VP1* usando el método de máxima verosimilitud. Solo se incluyó una secuencia por paciente. (B) Distribución filogenética de mutaciones en el codón 269. El árbol representa los genes *VP1* (marcados con números GI) de virus aislados de pacientes con LMP. Las mutaciones en los codones de Ser269 se indican mediante inserciones de texto. Los círculos en las ramas reflejan el apoyo aLRT. La posición 269 se enmascaró antes de construir el árbol para evitar la atracción de ramas con mutaciones de este codón. Se usó el método PhyML de máxima verosimilitud [Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52: 696-704.] con el modelo de sustitución F84 [Kishino H, Hasegawa M (1989) Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in hominoidea. *J Mol Evol* 29: 170-179 y Felsenstein J, Churchill GA (1996) A Hidden Markov Model approach to variation among sites in rate of evolution. *Mol Biol Evol* 13: 93-104]. La aplicación de varios métodos incorporados en el paquete PHYLIP de método de máxima verosimilitud, los métodos de reconstrucción filogenética basados en la distancia y basados en la parsimonia produjeron resultados similares. Las secuencias virales aisladas de pacientes con LMP no se agrupan en el árbol filogenético y se distribuyen ampliamente entre los tipos virales y los orígenes geográficos de las muestras (**FIG. 4a**). Esto está respaldado además por una medida de estratificación de población muy baja F_{ST} [Slatkin M, Maddison WP (1990) Detecting isolation by distance using phylogenies of genes. *Genetics* 126: 249-260](1,8 %). De acuerdo con estudios anteriores [Zheng HY, Takasaka T, Noda K, Kanazawa A, Mori H, et al. (2005) New sequence polymorphisms in the outer loops of the JC polyomavirus major capsid protein (VP1) possibly associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Gen Virol* 86: 2035-2045, Jobes DV, Chima SC, Ryschkewitsch CF, Stoner GL (1998) Phylogenetic analysis of 22 complete genomes of the human polyomavirus JC virus. *J Gen Virol* 79 (Pt 10): 2491-2498, y Agostini HT, Deckhut A, Jobes DV, Girones R, Schlunck G, et al. (2001) Genotypes of JC virus in East, Central and Southwest Europe. *J Gen Virol* 82: 1221-1331], los virus que causan LMP no se limitan a un tipo filogenético viral específico.

Se usaron secuencias de virus aislados de pacientes con LMP, así como de sujetos sanos con el objetivo de determinar si la presión selectiva evolutiva asociada a LMP está actuando sobre el gen *VP1* viral. Este análisis utilizó el paquete PAML [Yang Z (1997) PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput Appl Biosci* 13: 555-556] diseñado para identificar la presencia de codones que evolucionan bajo selección positiva. PAML evalúa múltiples modelos evolutivos usando el ensayo de razón de verosimilitud paramétrica. Se ensayaron varios modelos, incluyendo un modelo de evolución neutra, un modelo casi neutro que permite la selección por purificación (p. ej., negativa) y un modelo heterogéneo que permite que algunas posiciones de codones evolucionen bajo selección positiva y otras posiciones de codones evolucionen bajo selección negativa o neutra (**Tabla 5**). También se ensayaron varios modelos más complejos.

En el caso de secuencias de *VP1* de VJC aisladas de sujetos sanos, el modelo evolutivo casi neutro que implica una mezcla de codones de evolución neutra y codones bajo selección de purificación claramente superó al modelo puramente neutro (valor de p $7,0 \times 10^{-6}$). Sin embargo, no se encontró apoyo estadístico para modelos más complejos, incluyendo modelos con selección positiva. Por el contrario, para las secuencias de *VP1* aisladas de pacientes con LMP, la permisión de que los codones evolucionen bajo selección positiva condujo a un aumento muy significativo en la probabilidad del modelo (**Tabla 5**). El modelo con tres categorías de sitios, incluyendo los sitios que evolucionan bajo selección de purificación, sitios neutros y sitios bajo selección positiva, explicó los datos significativamente mejor que el modelo casi neutro limitado solo a sitios neutros y los sitios bajo selección de purificación (valor de p $2,5 \times 10^{-7}$). Los modelos más complejos no mostraron una mejora significativa con respecto al modelo más simple con tres categorías de codones.

Se identificaron cuatro posiciones de codones (correspondientes a los aminoácidos 55, 60, 267 y 269) que evolucionaron bajo selección positiva en el muestreo de LMP de secuencias de longitud completa (**Tabla 5**). Las probabilidades posteriores bayesianas para la selección positiva computadas por PAML fueron superiores a 0,5 para estas posiciones de codones. La probabilidad posterior para la selección positiva en el codón 269 fue cercana a 1. Para aumentar el poder de análisis, se añadieron secuencias de *VP1* parciales del virus JC aislado de pacientes con LMP. La adición de secuencias parciales reveló una señal de selección positiva en el codón 265 (**Tabla 5**).

Tabla 5. Codones bajo selección positiva en la muestra de LMP.

<i>Mutaciones</i>			<i>Conjunto de secuencias de longitud completa</i> (n = 28)	<i>Conjunto de secuencias parciales</i> codones 43-287 (n = 42)
			<i>Valor p para el ensayo de selección positiva</i>	
			2,5x10 ⁻⁷	3,5x10 ⁻⁶
<i>Posición</i>	<i>WT</i>	<i>Mutante</i>	<i>Probabilidad posterior de Bayes Empírico de Bayes</i>	
55	L	F	0,82	0,94
60	K	M,E,N	<0,5	0,94
265	N	D,T	<0,5	0,85
267	S	F,L	0,80	0,92
269	S	F,Y,C	1,00	1,00

5 En este ejemplo, no se observaron dos mutaciones de *VP1* en el mismo aislado de VJC. El análisis por el método de Spidermonkey [Poon AF, Lewis FI, Frost SD, Kosakovsky Pond SL (2008) Spidermonkey: rapid detection of co-evolving sites using Bayesian graphical models. *Bioinformatics* 24: 1949-1950] reveló interacciones epistáticas entre las posiciones 55 y 269 y entre la posición 60 y 269 (con probabilidades posteriores 0,88 y 0,70, respectivamente). Esto puede reflejar interacciones epistáticas de "retorno decreciente", p. ej., mutaciones posteriores no son beneficiosas y posiblemente perjudiciales en el contexto de una sola mutación.

10 Todas las sustituciones en estos cinco codones están claramente asociadas con LMP. Al menos el 52 % de los virus JC (o 36 de 69 secuencias, incluyendo las secuencias parciales) aislados de pacientes con LMP tienen al menos una de estas mutaciones, mientras que ninguna de estas sustituciones se ha observado en 253 secuencias virales de longitud completa de sujetos sanos (Tabla 6).

Posición	Referencia	no LMP			LMP		
		Secuencias con sustituciones, (total)	% de secuencias con sustituciones	Mutación o mutaciones	Secuencias con sustituciones, (total)	% de secuencias con sustituciones	Mutación o mutaciones
8	G	4 (253)	2	4A	0 (32)	0	
37	I	8 (253)	3	8V	0 (64)	0	
52	D	1 (253)	0	1N	0 (64)	0	
55	L	0 (253)	0		10 (64)	16	10F
60	K	1 (253)	0	1R	4 (64)	6	2M 1E 1N
61	S	0 (253)	0		5 (64)	8	1L 4P
64	D	0 (253)	0		6 (64)	9	5H 1N
69	E	5 (253)	2	5D	2 (64)	3	2D
70	S	2 (253)	1	2G	0 (64)	0	
74	N	6 (253)	2	6S	12 (64)	19	12S
75	K	2 (253)	1	2R	2 (64)	3	2R
107	T	0 (253)	0		1 (64)	2	1N
113	I	59 (253)	23	59L	18 (64)	28	18L
115	V	1 (253)	0	1E	0 (64)	0	
117	T	23 (253)	9	23S	15 (64)	23	15S
123	S	0 (253)	0		3 (64)	5	3C
128	T	25 (253)	10	25A	18 (64)	28	18A
129	H	0 (253)	0		1 (64)	2	1R
131	N	1 (253)	0	1K	0 (64)	0	
134	A	186 (253)	74	186G	59 (64)	92	59G
153	E	1 (253)	0	1K	0 (52)	0	
158	V	5 (253)	2	5L	3 (52)	6	3L
164	T	177 (253)	70	176K 1M	48 (52)	92	48K
167	D	1 (253)	0	1H	0 (52)	0	
171	F	1 (253)	0	1Y	0 (52)	0	
185	E	1 (253)	0	1D	0 (52)	0	
192	K	2 (253)	1	2E	0 (52)	0	
223	V	0 (253)	0		1 (56)	2	1A
258	D	1 (253)	0	1Y	0 (56)	0	
265	N	0 (253)	0		4 (56)	7	3D 1T
267	S	0 (253)	0		4 (56)	7	3F 1L
269	S	2 (253)	1	1A 1T	13 (56)	24	9F 3Y 1C
271	Q	0 (253)	0		1 (56)	2	1H
277	R	1 (253)	0	1K	0 (56)	0	
287	R	1 (253)	0	1K	0 (56)	0	
310	D	1 (253)	0	1N	0 (56)	0	
320	Q	1 (253)	0	1H	0 (56)	0	
321	I	134 (253)	53	134V	32 (34)	88	30V
332	Q	184 (253)	73	184E	33 (34)	91	31E
345	R	20 (253)	8	20K	8 (34)	18	6K

Los residuos resaltados con sombreado más oscuro son distintos entre los grupos de LMP y no LMP y tienen una probabilidad posterior de Bayes Empírica de Bayes para selección positiva >0,5 (Tabla 5). Los residuos resaltados con sombreado más claro son distintos entre los grupos de LMP y no LMP.

- 5 Se detectó la señal más fuerte de selección positiva en la muestra de LMP para el codón que codifica el aminoácido en la posición 269. La FIG. 4b muestra que se observaron múltiples mutaciones independientes de Ser269 a los residuos aromáticos fenilalanina y tirosina en VP1 de virus asociados a LMP. La existencia de múltiples mutaciones independientes no es un artefacto de la reconstrucción filogenética porque los linajes con variantes mutantes están separados por múltiples ramas con más del 90 % de apoyo por análisis de arranque y apoyo del ensayo de razón de verosimilitud implementada en PhyML [Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst Biol 52: 696-704]. Estos linajes corresponden a diferentes tipos filogenéticos de virus JC previamente identificados y provienen de diversas ubicaciones geográficas [Jobses DV, Chima SC, Ryschkewitsch CF, Stoner GL (1998) Phylogenetic analysis of 22 complete genomes of the human polyomavirus JC virus. J Gen Virol 79 (Pt 10): 2491-2498 y Agostini HT, Deckhut A, Jobses DV, Girones R, Schlunck G, et al. (2001) Genotypes of JC virus in East, Central and Southwest Europe. J Gen Virol 82: 1221-1331].
- 10
- 15

Las secuencias de VP1 aisladas de pacientes con PML y subconjuntos aleatorios de secuencias aisladas de sujetos sanos se analizaron adicionalmente usando PAML [Yang Z (1997) PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. Comput Appl Biosci 13: 555-556].

Se examinaron múltiples modelos de evolución de secuencia incorporados en PAML, incluyendo el modelo puramente neutral (M0), el modelo casi neutral (M1), el modelo con selección positiva (M2) y modelos más complejos adicionales (M3-M8). Se usó un ensayo de razón de verosimilitud (LRT) para comparar la diferencia entre los modelos M1 y M2 para ensayar la selección positiva. Los valores P para la selección positiva en tres conjuntos de datos se muestran junto con las probabilidades posteriores bayesianas para cada posición de codón. Se muestran los residuos con probabilidades posteriores de Bayes Empíricas de Bayes superiores a 0,5.

Ejemplo 5: las mutaciones identificadas se encuentran en el sitio de unión al ácido siálico

Métodos:

Se construyó un modelo de homología de la unidad pentamérica de la proteína VP1 de VJC con MODELER [Sali A, Blundell TL (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234: 779-815] usando la estructura de VP1 de MPyV (ID del banco de datos de proteínas: 1VPS [Stehle T, Harrison SC (1997) High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *Embo J* 16: 5139-5148] como molde. El modelo de tetrasacárido NeuNAc-(α 2,3)-Gal-(β 1,3)-[(α 2,6)-NeuNAc]-Glc-NAc se construyó tomando como base la estructura de NeuNAc-(α 2,3)-Gal-(β 1,3)-[(α 2,6)-NeuNAc]-Glc-NAc unido a VP1 de MPyV [Stehle T, Harrison SC (1997) High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *Embo J* 16: 5139-5148]. El modelo de VP1 de VJC/tetrasacárido NeuNAc-(α 2,3)-Gal-(β 1,3)-[(α 2,6)-NeuNAc]-Glc-NAc se refinó exhaustivamente en CHARMM [Brooks BR, Brucoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, et al. (1983) CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of Computational Chemistry* 4: 187-217] y se analizó utilizando el software de visualización PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, EE. UU. www.pymol.org).

Resultados:

Según aspectos de la invención, el papel funcional de las cinco posiciones de aminoácidos identificadas puede evaluarse construyendo un modelo molecular tridimensional de VP1 del virus JC unido al tetrasacárido NeuNAc-(α 2,3)-Gal-(β 1,3)-[(α 2,6)-NeuNAc]-Glc-NAc tomando como base la estructura cristalina del complejo VP1 de MPyV/oligosacárido [Stehle T, Harrison SC (1997) High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *Embo J* 16: 5139-5148]. El modelo estructural mostrado en la **FIG. 5a** sugiere que todos los aminoácidos identificadas con PAML están agrupados en la superficie de la proteína VP1 en el sitio de unión del ácido siálico y es probable que estén implicados en la unión del ácido siálico. La **FIG. 5** es un modelo estructural del complejo VP1 de VJC/tetrasacárido NeuNAc-(α 2,3)-Gal-(β 1,3)-[(α 2,6)-NeuNAc]-Glc-NAc. (A) Un modelo de pentámero básico VP1 de VJC en complejo con el tetrasacárido NeuNAc-(α 2,3)-Gal-(β 1,3)-[(α 2,6)-NeuNAc]-Glc-NAc. Se muestran las superficies de cinco cadenas de VP1 de VJC. Se muestra el resto RG esencial para la unión del ácido siálico central. Se indican los residuos mutados asociados a LMP confirmados por PAML (L55, K60, S265, S267, S269). También se muestran mutaciones adicionales exclusivas de las muestras aisladas de LMP (S61, D66, S123, H129, V223 y Q271). (B) Una vista de cerca del complejo tetrasacárido NeuNAc-(α 2,3)-Gal-(β 1,3)-[(α 2,6)-NeuNAc]-Glc-NAc/VP1 de VJC. La ubicación de V296 de VP1 de MPyV, que se prevé que sea equivalente a S269 de VP1 de VJC, se muestra en malla. Además, en algunas realizaciones, las sustituciones L55F, K60M, S267F y S269F pueden inducir choques estéricos con el sacárido modelado que conducen a una disminución en la afinidad de la interacción. La afinidad al ácido siálico se relacionó con la patogenicidad viral en múltiples estudios del virus de la gripe, poliomavirus de ratón y virus diminutos de ratón [Srinivasan A, Viswanathan K, Raman R, Chandrasekaran A, Raguram S, et al. (2008) Quantitative biochemical rationale for differences in transmissibility of 1918 pandemic influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 2800-2805, Bauer PH, Cui C, Liu WR, Stehle T., Harrison SC, et al. (1999) Discrimination between sialic acid-containing receptors and pseudoreceptors regulates polyomavirus spread in the mouse. *J Virol* 73: 5826-5832 y Nam HJ, Gurda-Whitaker B, Gan WY, Ilaria S, McKenna R, et al. (2006) Identification of the sialic acid structures recognized by minute virus of mice and the role of binding affinity in virulence adaptation. *J Biol Chem* 281: 25670-25677. En particular, la patogenicidad del poliomavirus de ratón, un pariente cercano del virus JC, se mapeó en una sustitución de aminoácido de VP1 en la posición 296 [Bauer PH, Bronson RT, Fung SC, Freund R, Stehle T, et al. (1995) Genetic and structural analysis of a virulence determinant in polyomavirus VP1. *J Virol* 69: 7925-7931], una posición ortóloga a la posición 269 en el virus JC humano que mostró la señal más fuerte de selección positiva en los aislados virales causantes de LMP en este estudio. Como se muestra en la **FIG. 5b**, la serina 269 del virus JC humano y la valina 296 del poliomavirus de ratón ocupan ubicaciones idénticas en el bolsillo de unión del ácido siálico.

Las posiciones 61, 66, 123, 129, 223 y 271 están todas limitadas a la muestra de LMP (**Tabla 6**) y también se alinean con el bolsillo de unión del ácido siálico (**FIG. 5b**). Es posible que esos residuos no fueran detectados por el análisis PAML debido al pequeño tamaño de la muestra y que el desarrollo de LMP se acompañe de una selección positiva de los aminoácidos implicados en la unión del ácido siálico en la mayoría de los casos. La longitud del árbol filogenético en el análisis es corta, lo que limita el poder para detectar la selección positiva [Anisimova M, Bielawski JP, Yang Z (2001) Accuracy and power of the likelihood ratio test in detecting adaptive molecular evolution. *Mol Biol Evol* 18: 1585-1592 y Anisimova M, Bielawski JP, Yang Z (2002) Accuracy and power of bayes prediction of amino acid sites under positive selection. *Mol Biol Evol* 19: 950-958]. El ensayo de razón de verosimilitud para detectar selección positiva usando un árbol corto es conservador [Anisimova M, Bielawski JP, Yang Z (2001) Accuracy and power of the likelihood

ratio test in detecting adaptive molecular evolution. *Mol Biol Evol* 18: 1585-1592], y el análisis de Bayes Empírico de Bayes tiene un poder limitado [Anisimova M, Bielawski JP, Yang Z (2002) Accuracy and power of bayes prediction of amino acid sites under positive selection. *Mol Biol Evol* 19: 950-958]. Por lo tanto, también se pueden seleccionar positivamente mutaciones adicionales de VP1 específicas de LMP. Las mutaciones en el residuo 107 también se encuentran exclusivamente en la muestra de LMP. Sin embargo, no mostró evidencia de selección positiva según PAML y no se encuentra en el bolsillo de unión del ácido siálico.

Ejemplo 6: mutantes de VJC y unión al ácido siálico

Métodos: ensayo de hemaglutinación y partículas similares a virus

El ensayo de hemaglutinación se realizó como se ha descrito anteriormente [Chapagain ML, Nguyen T, Bui T, Verma S, Nerurkar VR (2006) Comparison of real-time PCR and hemagglutination assay for quantitation of human polyomavirus JC. *Virology* 33: 3 Padgett BL, Walker DL (1973) Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* 127: 467-470]. Brevemente, se lavó dos veces sangre humana de tipo O y se suspendió en tampón de Alsever (citrato de sodio 20 mM, NaCl 72 mM, glucosa 100 mM, pH 6,5 ajustado con ácido acético) a una concentración final del ~0,5 %. Se prepararon diluciones seriadas de dos veces de VLP en tampón de Alsever y se añadió un volumen igual de RBC en cada pocillo de una placa de microtitulación de fondo en "U" de 96 pocillos y se incubó a 4 °C durante 3-6 h. La concentración mínima de HA es la concentración más baja de proteína VLP que aún aglutina los RBC.

Los genes que codifican la proteína VP1 de las cepas de virus JC BAE00117, AAT09831 y AAQ88264 se crearon sintéticamente y se clonaron en el vector lanzadera Gateway pDEST8 (Invitrogen) para su transferencia al sistema de expresión de baculovirus pFASTBAC para la expresión de baculovirus en células SF9. La purificación de las VLP se realizó a partir de aproximadamente 100 gramos de sedimentos celulares congelados de 5 litros de cultivo. Las células se resuspendieron en 500 ml de PBS que contenía CaCl₂ 0,1 mM. Las células se rompen pasando la suspensión celular dos veces a través de un microfluidizador Microfluidics. Los restos celulares se eliminaron sedimentando a 8.000 X G durante 15 minutos. El volumen de sobrenadante se ajustó a 720 ml con PBS/CaCl₂ y se cargó en 5 ml de almohadillas de sacarosa al 40 %. Las partículas similares a virus se sedimentaron dos veces a través de almohadillas de sacarosa en un rotor SW28 a 100.000 X G durante 5 horas. Los sedimentos de VLP se resuspendieron en PBS/CaCl₂ y después se trataron con desoxicolato al 0,25 % durante 1 hora a 37 °C seguido de la adición de NaCl 4M/CaCl₂ 0,1 mM durante 1 hora a 4 °C. El material precipitado se eliminó mediante centrifugación a 8.000 X G durante 15 minutos. El sobrenadante resultante se concentró y se intercambió el tampón por ultrafiltración a través de una membrana Pelicon-2 500.000 MWCO (Millipore). Las VLP concentradas se aplicaron en el centro de un gradiente por etapas del 25-40 % de Optiprep (Sigma) y se segmentaron en bandas a 190.000g durante 17 horas en un rotor de tipo 50.2. Las bandas de VLP se recogieron y después se concentraron y se intercambió el tampón en una celda agitada Amicon con una membrana 300.000 MWCO. La calidad de la VLP se determinó mediante electroforesis en gel y microscopía electrónica (FIG. 6). La concentración de proteína se determinó mediante el ensayo Micro BCA (Pierce). La microscopía electrónica se realizó en el Departamento de Biología Celular de la Escuela de Medicina de Harvard. Las muestras de VLP se colocaron en rejillas de carbón, se lavaron brevemente en agua y se tiñeron negativamente con acetato de uranilo y se dejaron secar. Las rejillas se vieron y se tomaron imágenes en un Technai G2 Spirit BioTWIN TEM.

Resultados:

Con el fin de verificar experimentalmente el papel que desempeñan estas sustituciones en la unión del ácido siálico por la cápside VP1, se produjeron de forma recombinante partículas similares a virus (VLP) a partir de la proteína VP1 codificada por varios virus naturales diferentes. Las VLP se generaron a partir de secuencias de VP1 virales que codifican sustituciones con una de las dos señales más fuertes de selección positiva identificadas por PAML, una con fenilalanina en la posición 269 (F269) y otra con fenilalanina en la posición 55 (F55). Dos genes de VP1 diferentes que se usaron como controles no albergan ninguna de las mutaciones asociadas a LMP identificadas, una de un individuo sano (WT) y otra de un paciente con LMP (Mad-1) (Tabla 7).

Tabla 7. Variabilidad de aminoácidos de las secuencias de VP1 de VJC entre VLP.

	55	74	75	117	128	134	158	164	269	321	332	345
WT1 AAQ88264	L	N	K	T	T	A	V	T	S	I	Q	R
55F AAT09831	F	N	K	T	T	A	V	T	S	I	Q	R
WT2(Mad-1) P03089	L	N	R	S	T	G	L	K	S	V	E	K
269F BAE00117	L	S	K	S	A	G	V	K	F	V	E	K

Se ha mostrado que la hemaglutinación viral de glóbulos rojos (RBC) es una medida fiable de la unión del ácido siálico por poliomavirus [Freund R, Garcea RL, Sahli R, Benjamin TL (1991) A single-amino-acid substitution in polyomavirus VP1 correlates with plaque size and hemagglutination behavior. J Virol 65: 350-355 y Liu CK, Wei G, Atwood WJ (1998) Infection of glial cells by the human polyomavirus JC is mediated by an N-linked glycoprotein containing terminal alpha(2-6)-linked sialic acids. J Virol 72: 4643-4649]. Las cuatro VLP se ensayaron en un ensayo de hemaglutinación. Sorprendentemente, las variantes F55 y F269 mostraron una actividad de HA más de 8.000 veces menor que cualquiera de las VLP de control (**Tabla 7A**). Específicamente, la variante F55 fracasó por completo en aglutinar los RBC de tipo O humanos incluso a 200 µg/ml, la concentración más alta ensayada, y la variante F269 mostró una actividad HA muy baja ya que causó hemaglutinación solo a concentraciones superiores a 25 µg/ml. Al mismo tiempo, las variantes que albergaban L55 y S269 (WT y Mad-1) causaron hemaglutinación de los RBC a concentraciones tan bajas como 0,375ng/ml y 6,25 ng/ml, correspondientemente. En este ejemplo, el mutante F55 tiene la diferencia de un solo aminoácido con su correspondiente variante de tipo salvaje (WT). Por lo tanto, el cambio en la hemaglutinación se puede atribuir específicamente a este reemplazo de aminoácidos. Además del cambio en la posición 269, la variante mutante F269 tiene dos posiciones de aminoácidos adicionales que son diferentes de su correspondiente variante de control (Mad-1). Estos dos cambios de aminoácidos no son específicos de la LMP y es poco probable que expliquen la diferencia en la hemaglutinación. Aunque el aislado de Mad-1 se había originado en un paciente con LMP [Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH (1971) Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. Lancet 1: 1257-1260] no contiene ninguna de las mutaciones específicas de LMP que se correlacionan bien con su capacidad para hemaglutinar los RBC. La falta de mutaciones que producen LMP en este aislado de LMP sugiere que las mutaciones de VP1 no son un mecanismo exclusivo que conduce al desarrollo de LMP.

Tabla 7A. Los residuos 55 y 269 en la proteína VP1 desempeñan un papel muy importante en la hemaglutinación de los RBC por partículas similares a virus (VLP).

Variante viral	Concentración mínima de VLP para HA, ng/ml
WT1	0,08
55F	>200.000
WT2 (Mad-1)	6,25
269F	50.000

La hemaglutinación se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos usando diluciones seriadas de las VLP empezando a partir de 200 µg/ml. Se añadieron las VLP a RBC tipo O y se incubaron a 4 °C durante 3 horas. La aglutinación se visualiza por la falta de un sedimento redondo formado por la sedimentación de los RBC de la suspensión. E55 es una variante de VP1 con fenilalanina en la posición 55 (AAT09831), F269 es una variante de VP1 con fenilalanina en la posición 269 (BAE0011). WT (AAQ88264) y Mad-1 (P03089) son variantes de VP1 con leucina y serina en las posiciones 55 y 269, respectivamente.

Las secuencias de proteínas se alinearon usando ClustalW, los aminoácidos diferentes en al menos una secuencia del resto de secuencias se muestran con sus posiciones indicadas.

Ejemplo 7: los VJC mutantes tienen una unión alterada a los gangliósidos.

ELISA de gangliósidos:

Los siguientes gangliósidos se prepararon a 1 mg/ml en metanol: GM1 asialo (humano), GM1 monosialo (humano), GM2 (humano), GM3 (bovino), GM4 (humano), GD1a disialo (bovino), GD1b (humano), GD2 (humano), GD3 (bovino), GT1b trisialo (bovino). Todos los gangliósidos adquiridos en Calbiochem excepto el GM2 que se adquirió en American RadioChemicals.

Los gangliósidos se diluyeron hasta 0,1 mg/ml en metanol y se añadieron 0,1 ml/pocillo de una placa de ELISA (Coming 9018); se dejó que el metanol se evaporara toda la noche. Al día siguiente, las placas se bloquearon con 0,25 ml/pocillo de IX PBS con Ca²⁺ y Mg²⁺, BSA al 1 % (Fracción V), Tween-20 al 0,1 % durante una hora. A continuación, las placas se transfirieron a hielo - todas las incubaciones consiguientes se realizaron a + 4 °C.

Las VLP se prepararon a 0,03 mg/ml en tampón de bloqueo; el tampón se retiró de la placa y las VLP se añadieron a 0,1 ml/pocillo. La placa se incubó en hielo durante 60-90 minutos. Se preparó anti-VP1 de VJC (clon PAB597) a 0,002 mg/ml en tampón de bloqueo. Las placas se lavaron con 0,25 ml/pocillo de tampón de bloqueo; se añadió anti-VP1 a 0,1 ml/pocillo. La placa se incubó en hielo durante 45 - 60 minutos. Se preparó IgG anti-ratón de cabra conjugada con HRP (H+L) (Jackson ImmunoResearch) a 1: 5.000 en tampón de bloqueo. La placa se lavó; se añadieron 0,1 ml/pocillo de HRP-anti-ratón. La placa se incubó en hielo durante 30 minutos. La placa se lavó y se reveló con 0,1 ml de 1-Step Turbo TMB (Thermo Scientific Pierce). El desarrollo del color se monitorizó y la reacción se paró con la

adición de 0,1 ml de H₃PO₄ 2N. A continuación, se leyeron las placas a 450 nm en un espectrofotómetro (Molecular Devices).

Cada gangliósido tenía pocillos de control (HRP-IgG anti-ratón solamente, PAB597 y HRP-IgG anti-ratón). El control de fondo se designó como HRP-IgG anti-ratón solamente. Cada pocillo experimental se calculó usando la fórmula (Experimental - Fondo)/Fondo.

La unión de VJC WT se evaluó frente a una variedad de gangliósidos. La FIG. 7 muestra que VJC WT se une a algunos glicanos, pero no a todos. La estructura de los gangliósidos seleccionados se muestra en la FIG. 8 y se indica su capacidad para unirse a VJC WT.

La FIG. 9 muestra que las mutaciones F55 y F269 no son capaces de unirse a los glicanos Neu5Ac α (2-3) y α (2-6). La estructura de los gangliósidos seleccionados se muestra en la FIG. 10 y se indica su capacidad para unirse a VJC mutante.

La FIG. 11 compara la capacidad de VJC WT y mutante para unirse a gangliósidos seleccionados.

Ejemplo 8: el VJC mutante se une a las líneas de células gliales pero no a los linfocitos.

Análisis de citometría de flujo de tinción de VLP;

Se usaron las siguientes células: SVG-A (regalo de Walter Atwood), células mononucleares periféricas aisladas de donantes. Las células adherentes se despegaron usando Accutasa, se recogieron y lavaron. La sangre venosa se extrajo de donantes sanos; las PMBC se aislaron usando un protocolo estándar que implicaba centrifugación sobre Ficoll-Hypaque Plus (Amersham Biosciences).

Todas las tinciones se realizaron en hielo en tampón PBS que contenía calcio y magnesio, albúmina de suero bovino al 1 % (fracción V), azida de sodio 2 mM.

Las células (1 - 5 x 10⁵ células/muestra) se incubaron con 10 μ g/ml de VLP diluido en tampón FACS, en un volumen total de 0,05 ml, en hielo durante 60 - 90 minutos en una placa de fondo en V de 96 pocillos. Las células se lavaron con

0,15 ml de tampón FACS y se centrifugaron a 2.000 rpm (~800 x g) durante 5 minutos. La unión de VLP se detectó tiñendo las células con anti-VP1 de VJC (clon PAB597) a 0,002 mg/ml en 0,05 ml durante 45 - 60 minutos, seguido de una etapa de lavado y detección con Alexa Fluor 488 IgG anti-ratón (H+L) (Invitrogen) diluido 1:100 en 0,05 ml/muestra durante

30-45 minutos adicionales. Las células se lavaron y se fijaron en 0,05 ml de Cytofix/Cytoperm (BD) durante 15 - 25 minutos, se lavaron y se resuspendieron en 0,2 ml de tampón FACS. Las muestras se analizaron en un FACS Calibur.

VJC mutante (269F) no se une a los linfocitos. Sin embargo, el VJC mutante todavía es capaz de unirse a líneas de células gliales (FIG. 12). También se muestran VJC WT y un control negativo.

Ejemplo 9: generación de anticuerpos anti-VJC específicos mutantes.

Para la inmunización de conejos para generar sueros anti-VP1 de VJC, se inyectaron subcutáneamente 0,5 mg de proteína VP1 en la forma de partículas similares a virus (VLP) en tampón PBS en 10 puntos en la espalda de los conejos (0,05 mg/punto). La inmunización primaria fue seguida de 2 refuerzos a intervalos de 2 semanas, después de lo cual, se recogieron sueros y se analizaron para determinar la actividad anti-VP1.

Detección de anticuerpo anti-VJC mutante mediante ELISA de competición:

A: el antisuero de conejos inmunizados con VLP-269F o el antisuero de conejos inmunizados con VLP WT-MAD1 se preincubó con o sin 100 μ g/ml de T-MAD1-VLP y luego se incubó con una placa recubierta con 269F -VLP. Los anticuerpos unidos se revelaron con un anticonejo conjugado con peroxidasa.

B: el antisuero de conejos inmunizados con 55F-VLP o el antisuero de conejos inmunizados con WT-VLP se preincubó con o sin 100 μ g/ml de WT-VLP, y luego se incubó con una placa recubierta con 55F-VLP. Los anticuerpos unidos se revelaron con un anticonejo conjugado con peroxidasa.

Se inyectó a los conejos VLP de VP1 de VJC mutante F269 y F55, lo que resultó en la generación de anticuerpos específicos para VJC mutantes. Un ELISA de competición mostró que los anticuerpos de VJC específicos mutantes se pueden distinguir de un anticuerpo de VJC WT (FIG. 13). La configuración del ensayo se ilustra en la FIG. 14. Los anticuerpos se unen a las VLP mutantes (ya sea F55 o F269) capturadas en la placa. La competición se realiza con VLP no mutante para absorber todos los anticuerpos dirigidos al "núcleo" de la molécula, dejando que solo se unan a la placa y se detecten los anticuerpos frente a epítomos mutantes (si estos están presentes en la muestra).

Los anticuerpos de VJC mutante y VJC WT también se compararon para determinar su capacidad para unirse a una VJC-VLP mutante. Se recubrieron placas de ELISA con polipéptidos VJC mutantes F269 y F55 y se añadieron anticuerpos de VJC WT y VJC mutante a las placas (FIG. 15 y 16). Tanto los anticuerpos de VJC mutantes como WT

se unen a la placa ELISA recubierta. La adición de VJC WT (VJC-471 y VJC-MAD1) dio como resultado la desaparición de la unión del anticuerpo de VJC WT, mientras que los anticuerpos de mutantes permanecen unidos a la placa ELISA. Además, la adición del virus VJC dio como resultado la desaparición del anticuerpo de WT unido, mientras que el anticuerpo de mutante permanece unido a la placa.

5 Ejemplo 10: mutaciones de VJC-VP1 como mecanismo de escape inmune viral en algunos pacientes

El suero de un paciente que porta la mutación 269F en la proteína VP1 o suero de conejo inmunizado con VLP anti-WT-MAD1 (como control positivo) se preincubó con o sin 100 µg/ml de WT-MAD1-VLP, y luego se incubó con una placa recubierta con 269F-VLP. Los anticuerpos unidos se revelaron con un anticuerpo anti-humano o de conejo conjugado con peroxidasa para detectar la unión del anticuerpo a la VLP mutante 269F usada como recubrimiento.

10 La **FIG. 17** muestra que un paciente que tiene el virus mutante F269 ha desarrollado una respuesta de anticuerpos frente al virus WT pero no frente al virus mutante F269.

La **FIG. 18** muestra que (parte superior) el conejo inmunizado con VLP no mutante genera anticuerpos frente al sitio (S269 en estos casos) que podría ser mutado. En estos casos, el experimento se realizó de manera similar a los esquemas de la diapositiva 16 (inserto anterior) con varias diferencias, en lugar de la VLP mutante, se usó una VLP no mutante para recubrir la placa y la unión de anticuerpos en sueros compitió con proteína mutante (ya sea F55 o F269), por lo que solo el anticuerpo frente al epítipo AA no mutado quedaría para unirse a la placa. La (parte inferior) muestra el mismo experimento con una muestra de voluntarios sanos. Los resultados de la **Tabla 8** se basan en un experimento similar con varias muestras de voluntarios diferentes. La **Tabla 8** muestra que las personas que no padecen LMP pueden tener anticuerpos frente a los mutantes de la LMP. Esto muestra que algunas personas portan anticuerpos específicos para varios residuos en el sitio de unión del ácido siálico (p. ej., el paciente 29 tiene anticuerpos frente a L55 y S269), mientras que otras tienen anticuerpos solo frente a un sitio, L55 o S269, y otros para ningún sitio. Según los aspectos de la invención, los individuos que no tienen anticuerpos frente a los residuos en el sitio de unión del ácido siálico o solo frente a uno de esos residuos podrían ser más vulnerables a los mutantes de escape de VJC, ya que tendrían menos protección frente a los anticuerpos neutralizantes.

25 **Tabla 8**

ID del paciente	VLP CE50, dilución	L55	S269
9	24.820	+	+
19	81.850	-	-
22	14.150	-	+
29	6.034	+	+
31	802.500	-	-
33	870.400	-	-
39		-	+
42	4.161	-	+
49	5.506	-	-
51	51.480	-	-
59	2.802	-	-
60	2.423	-	-

Ejemplo 11: la VP1 del virus JC (VJC) del líquido cefalorraquídeo (LCR) y el plasma de pacientes con leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP) portan mutaciones específicas de los residuos de aminoácidos implicados en la unión del ácido siálico

30 Como se describe en la presente memoria, la LMP es actualmente la segunda causa más frecuente de muertes relacionadas con el SIDA. A diferencia de otras infecciones oportunistas, también ocurre en pacientes tratados con TARGA, ya sea poco después de comenzar o durante el tratamiento crónico exitoso. Después de la infección primaria, el agente causal, VJC, establece una infección benigna persistente en el tracto urinario y se excreta en la orina en el 30 % de las personas sanas. Los mecanismos que conducen a la reactivación de VJC y LMP no están claros, pero se sabe que la principal proteína de la cápside de VJC, VP1, está implicada en la entrada celular, mediante la unión con

residuos de ácido siálico de la célula y, recientemente, se han reportado sustituciones de aminoácidos en VP1 en la LMP.

5 Toda la región VJC-VP1 se amplificó, se clonó (2 a 48 clones por muestra, mediana 23) y se secuenció del LCR de 26 pacientes con LMP (20 con infección por VIH) y 11 muestras de plasma pareadas y 6 muestras de orina pareadas. De 9 pacientes, también se analizaron muestras secuenciales de LCR (n = 7) o plasma (n = 2). El ADN de VJC se midió mediante PCR en tiempo real. Se usó modelado 3D para mapear las mutaciones en la estructura de VP1.

Extracción de ADN y amplificación de VP1:

Se extrajo ADN de 200 µL de LCR, plasma u orina usando el Kit QIAamp Blood (Qiagen) y se eluyó en un volumen final de 50 µL.

10 Toda la región de VJC-VP1 se amplificó mediante PCR anidada con los siguientes cebadores: Externo (2.027 pb)

VP1-LF GCAGCCAGCTATGGCTTTAC (SEQ ID NO: 55)

VP1-LR GCTGCCATTCATGAGAGGAT (SEQ ID NO: 56)

Interno (1.233 pb)

VP1-SF CCTCAATGGATGTTGCCTTT (SEQ ID NO: 57)

VP1-SR AAAACCAAAGACCCCT (SEQ ID NO: 58)

15 Las mezclas de las reacciones de PCR consistieron en 5 µL de tampón de PCR 10X, 4 mM de cada dNTP, 0,7 µM de cebadores VP1-LF y VP1-LR en la primera ronda y cebadores VP1-SF y VP1-SR en la segunda ronda, 1,25 unidades de Platinum Taq HF (Invitrogen) y 1 µL de ADN extraído en un volumen total de 50 µL. Los parámetros del ciclado fueron (tanto para la primera como para la segunda ronda) 30 ciclos a 94 °C durante 20 segundos, a 58 °C durante 30 segundos y a 68 °C durante 90 segundos en un termociclador automático (Applied Biosystems).

20 Después de la primera amplificación con los cebadores externos, se transfirieron 2,5 µl del producto amplificado de la primera a la segunda mezcla de reacción. Después de la amplificación con los cebadores internos, se sometieron a electroforesis 10 µl del producto amplificado de la segunda mezcla en un gel de agarosa al 2 % que contenía 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Los resultados se fotografiaron bajo iluminación U.V. y se consideraron positivos cuando estaba presente una banda correspondiente al fragmento de ADN con la longitud de pb esperada.

Clonación de VP1 por PCR:

25 El producto de amplificación se purificó mediante el kit de purificación de Qiagen. Se añadieron A a los extremos del producto de PCR limpiado mediante Taq polimerasa (reacción de protuberancia de A) y la clonación se llevó a cabo mediante el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen). Se preparó ADN en minipreparación (Qiagen) a partir de colonias que contenían el producto de PCR de VP1 clonado.

Secuenciación VP1:

30 Se secuenciaron de dos a 48 clones para cada muestra (mediana 23). Después de la traducción de las secuencias de VP1, las mutaciones de aminoácidos se marcaron por comparación con la gran selección de secuencias de VP1 de los casos de LMP y no LMP. Solo se consideraron las mutaciones presentes en más de un clon por muestra.

PCR en tiempo real para la cuantificación de VJC-ADN:

35 El ADN de VJC se cuantificó en muestras de LCR, plasma y orina mediante PCR en tiempo real, como se ha descrito anteriormente (Bossolasco S, Calori G, Moretti F, Boschini A, Bertelli D, Mena M, Gerevini S, Bestetti A, Pedale R, Sala S, Sala S, Lazzarin A, Cinque P. Prognostic significance of JC virus DNA levels in cerebrospinal fluid of patients with HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. Clin Infect Dis. 2005 mar 1;40(5):738-44.)

Pacientes:

40 Los pacientes con LMP se seleccionaron en función de la disponibilidad de a) muestras pareadas de LCR y plasma u orina o b) muestras secuenciales de LCR, todas con ADN de VJC detectable por PCR en tiempo real. Se habían extraído muestras de pacientes seguidos en la Clínica de Enfermedades Infecciosas, Hospital San Raffaele, Milán, entre 1993 y 2008. Las partes alícuotas de las muestras se mantuvieron almacenadas a -80 °C hasta los análisis retrospectivos del presente estudio. La VP1 de VJC se amplificó con éxito a partir de un total de 26 muestras de LCR, 11 de plasma y 6 de orina de un total de 30 pacientes con LMP.

Análisis de muestras clínicas - Diseño del estudio:

1. Análisis de secuencias de LCR:

Se examinaron las secuencias de LCR de 26 pacientes (Tabla 9) y se analizaron tanto el tipo como la frecuencia de las mutaciones, así como sus correlaciones con las variables de los pacientes.

5 2. Análisis de secuencias de muestras pareadas de los mismos pacientes:

Se examinaron muestras pareadas de LCR/plasma/orina ("tripletes") en 2 pacientes. Se examinaron pares de LCR/plasma, LCR/orina y plasma/orina de, respectivamente, 6, 1 y 3 pacientes. Se compararon las secuencias obtenidas de tripletes y pares.

3. Análisis de secuencias de muestras secuenciales:

- 10 Estaban disponibles muestras secuenciales de LCR o plasma de 5 y 2 pacientes, respectivamente. Estas muestras se habían extraído cerca del diagnóstico de LMP (línea base) y en diferentes momentos después. De cada paciente, se analizaron de 2 a 3 muestras extraídas durante un marco de tiempo de 17 a 477 días. 5 de estos pacientes tuvieron un curso progresivo de LMP. Un paciente experimentó una respuesta virológica después del inicio de TARGA. Un paciente experimentó una remisión clínica y virológica después del tratamiento con citarabina, pero tuvo una recidiva de la LMP después de 6 meses y tras la retirada de la citarabina.
- 15

Tabla 9. Características de los 26 pacientes con LMP con análisis de VP1 de VJC

Estado de VIH (pos:neg)	20 : 6
Edad media	37
Sexo (M:F)	18 : 8
Copias de ADN de VJC/ml (mediana, IQR)	22.351 (6.416 - 1.178.877)
TARGA en curso (número de pacientes) *	6
Progresores frente a supervivientes (número de pacientes)	18 : 2
* Se refiere solo a pacientes con LMP relacionada con el VIH	

Análisis de muestras clínicas - Resultados:

1. Análisis de secuencias de LCR:

- 20 Las mutaciones de VP1 específicas de LMP se definieron como mutaciones que normalmente no están presentes en la orina de pacientes sin LMP. Estas mutaciones o deleciones no implican mutaciones en posiciones que determinan los genotipos de VP1 - que distinguen las secuencias de VP1 según su distribución geográfica.

Se identificó una de las 8 mutaciones o deleciones específicas de LMP diferentes en el LCR de 24 de 26 pacientes (92 %). Estas implicaron sustituciones de aminoácidos en uno de los bucles externos de VP1 de VJC (Tabla 10).

- 25 En todos los casos, casi todos los clones de la misma muestra contenían la mutación o la deleción. En 5 pacientes, se identificaron dos mutaciones o deleciones diferentes, ya sea en los mismos clones (n = 2) o en diferentes clones (n = 3).

Tabla 10. Mutaciones en VP1 de VJC en el LCR de pacientes con LMP

Pacientes	Bucle VP1	Mutación o deleción en VP1 (aa)	No. de pacientes
VIH-pos (n=20)	BC	51-52 del	1
		55F	5
		55F + 271H *	1
		61L	1
		61L + 55 del *	1
	DE	122R	2
		122R + 125-127 del	1
		122R + 2V **	1
	HI	265D	2
		267F + 61L *	1
169F		2	
		0	2
VIH-neg (n=6)	BC	55F	4
	HI	265H	1
		269F	1

Los bucles BC, DE y HI de VP1 de VJC se definen por la similitud de sus secuencias de aa con los bucles de VP1 de SV40 (Chang D, Liou ZM, Ou WC, Wang KZ, Wang M, Fung CY, Tsai RT. Production of the antigen and the antibody of the JC virus major capsid protein VP1. J Virol Methods 1996 mayo; 59 (1-2): 177-87), que se determinaron previamente mediante cristalografía de rayos X (Liddington RC, Yan Y, Moulai J, Sahli R, Benjamin TL, Harrison SC. Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. Nature 1991 nov 28; 354 (6351): 278-84).

* Estaba presente bien mutación/deleción en diferentes clones (55F+271H en 15 y 4 clones; 61L+55 del en 18 y 4 clones; 267F+61L en 15 y 4 clones)

** Ambas mutaciones/deleciones estaban presentes en cada clon

Se encontraron niveles más altos de ADN de VJC en LCR en pacientes con mutaciones de los bucles BC y HI que en aquellos con mutaciones del bucle DE o sin mutaciones (FIG. 19). No se observó correlación en pacientes con LMP asociada al VIH entre el tipo de mutación y el recuento de células CD4, el nivel de ARN del VIH-1 en plasma o el tiempo de supervivencia.

2. Análisis de secuencias de muestras pareadas:

El análisis de los 2 tripletes de LCR/plasma/orina mostró la misma mutación de VP1 específica de LMP en LCR y plasma, mientras que no hubo mutación de LMP en las secuencias de orina correspondientes (Tabla 11). De manera similar, se encontraron mutaciones idénticas específicas de LMP en secuencias de LCR y plasma de 6 pacientes con pares de LCR/plasma (Tabla 12), pero solo en LCR o plasma, pero no en secuencias de orina de 1 paciente con pares de LCR/orina o 3 pacientes con pares de plasma/orina (Tabla 13).

Tabla 11. Mutaciones de VP1 de VJC en muestras pareadas de LCR/plasma/orina de pacientes con LMP

ID Lab Pc	Tipo de muestra		Mutación de LMP	
1	LCR		269F	
	PLASMA*		269F	
	ORINA		0	
2	LCR		269F	
	PLASMA		269F	
	ORINA		0	

Tabla 12. Mutaciones de VP1 de VJC en muestras pareadas de LCR/plasma de pacientes con LMP

ID Lab Pc	Tipo de muestra	ADN de VJC c/mL	Mutación de LMP	
3	LCR		269F	
	PLASMA		269F	
4	LCR		269F	
	PLASMA		269F	
5	LCR		122R	
	PLASMA		122R	
6	LCR		0	
	PLASMA		0	
7	LCR		55F	
	PLASMA		55F	
8	LCR		269F	
	PLASMA		269F	

Tabla 13. Mutaciones de VP1 de VJC en muestras pareadas de LCR/orina o plasma/orina de pacientes con LMP

ID Lab Pc	Tipo de muestra		Mutación de LMP	
9	LCR		55F	
	ORINA		0	
10	PLASMA		122R	
	ORINA		0	
11	PLASMA**		55F	
	ORINA		0	
12	PLASMA		0	
	ORINA		0	

3. Análisis de secuencias de muestras secuenciales:

El análisis de muestras secuenciales de LCR o plasma reveló la persistencia de las mutaciones específicas de LMP en 7 pacientes con enfermedad progresiva y ADN de VJC estable o en aumento en LCR (Tablas 14 y 15).

- 5 En el paciente que experimentó una respuesta virológica, la mutación principal de LMP presente en la primera muestra de LCR ya no se encontró en una segunda muestra de LCR que mostraba una disminución del nivel de ADN de VJC; en esta última muestra, se observó la aparición de una mutación previamente representada como menor.

En el paciente que experimentaba una recidiva de LMP unos meses después de la remisión clínica y virológica de un primer episodio de LMP, estaban presentes dos mutaciones diferentes en las muestras de LCR extraídas durante los dos episodios.

10 Tabla 14. Mutaciones de LMP en pacientes con muestras secuenciales de LCR

ID Lab Pac	Días tras la primera muestra		Mutación de LMP
A	0		55F
	17		55F
	92		55F
B	0		269F
	208		265D
C	0		265D
	56		265D
D	0		55F
	66		55F
E	0		122R + 2V **
	477		122R + 2V **
F	0		51-52del
	230		51-52del
G	0		61L + 53-55 del *
	63		53-55del

Tabla 15. Mutaciones de LMP en pacientes con muestras de plasma secuenciales

ID Lab Pc	Días tras la primera muestra	Mutación de LMP	
H	0	269F	
	21	269F	
I	0	267Y	
	56	267Y	

Tablas 14 y 15, notas:

* Esta presente mutación/delección en diferentes clones (55F+271H en 15 y 4 clones; 61L+55 del en 18 y 4 clones; 267F+61L en 15 y 4 clones)

** Estaban presentes ambas mutaciones/delecciones en cada clon.

Modelado molecular de VJC-VP1:

Modelado molecular del complejo VP1 de VJC/tetrasacárido:

- 5 Se construyó un modelo de homología de la unidad pentamérica de la proteína VP1 de VJC con MODELER usando la estructura de VP1 de MPyV (ID del Banco de Datos de Proteínas: 1VPS como molde. El modelo de tetrasacárido NeuNAc-(α 2,3)-Gal-(β 1,3)-[(α 2,6)-NeuNAc]-Glc-NAc se construyó tomando como base la estructura de NeuNAc-(α 2,3)-Gal-(β 1,3)-[(α 2,6)-NeuNAc]-Glc-NAc unido a VP1 de MPyV. El modelo de VP1 de VJC/tetrasacárido NeuNAc-(α 2,3)-Gal-(β 1,3)-[(α 2,6)-NeuNAc]-Glc-NAc se refinó exhaustivamente en CHARMM y se analizó utilizando el software de visualización PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, EE. UU. <http://www.pymol.org>)

- 10 Por consiguiente, en comparación con el virus de tipo salvaje (que está presente en la orina de personas sanas), se identificó una de las 8 mutaciones o delecciones únicas específicas en casi todos los clones de LCR de cada uno de 24/26 pacientes (92 %). Estas conferían sustituciones o delecciones en uno de los tres bucles externos de VP1, que con mayor frecuencia implican los residuos 55 (55F, 7 pacientes, 27 %) y 269 (269F, 6 pacientes, 23 %). El plasma pareado siempre mostró la misma mutación en LCR, pero no se identificaron mutaciones en la orina. Las mutaciones se mantuvieron en muestras secuenciales de 7 pacientes con enfermedad progresiva y ADN de VJC estable o en aumento en LCR. Se perdieron en 2 pacientes: 1 en remisión y recidiva de LMP, con inicio de una nueva mutación; y 1 con ADN de VJC de LCR decreciente, con la aparición de una variante mutante diferente previamente menor.
- 15 Mediante el modelado 3D, todos los residuos mutados se agruparon en o en la proximidad inmediata del sitio de unión al receptor celular de ácido siálico en VP1.

- 20 Por lo tanto, según estos datos, en pacientes con LMP, el VJC que se encuentra en el LCR y el plasma, pero no en la orina, porta sustituciones de VP1 específicas de LMP. Estas sustituciones se mantienen durante la progresión de la enfermedad. Implican los bucles externos BC, DE o HI de VP1, en sitios críticos para la unión con el receptor celular del ácido siálico. Por consiguiente, en la LMP, el VJC del LCR y el plasma, pero no de orina, porta sustituciones de VP1 en sitios críticos para la unión celular, que se mantienen durante la enfermedad. Estos hallazgos apoyan un modelo por el cual el VJC adquiere cambios adaptativos durante la transición de los sitios de persistencia al cerebro, lo que eventualmente conduce a la LMP.

Ejemplo 12: residuos en el bolsillo de unión al ácido siálico de VP1

- 30 Los residuos en los 12 angstroms desde el azúcar que contiene ácido siálico modelado (como se describe en los Ejemplos de la presente memoria) se enumeran en la Tabla 16.

Tabla 16.

MET	48
GLY	49
ASP	50
PRO	51

ES 2 842 425 T3

ASP	52
GLU	53
HIS	54
LEU	55
ARG	56
GLY	57
MET	57
GLY	58
PHE	58
GLN	59
SER	59
LYS	60
PRO	60
SER	61
ILE	62
PRO	63
SER	63
ILE	64
SER	65
SER	65
ASP	66
LEU	66
THR	67
THR	67
GLU	68
PHE	68
GLU	69
GLY	69
GLY	70
SER	70
ASP	71
GLN	71
SER	72
TYR	72
PRO	73

ES 2 842 425 T3

TYR	73
ASN	74
GLY	74
LYS	75
TRP	75
ASP	76
SER	76
ARG	77
MET	77
GLY	78
LEU	78
ILE	79
PRO	79
ASN	80
LEU	81
ALA	82
THR	83
SER	84
ASP	85
THR	86
GLU	87
ASP	88
SER	89
PRO	90
GLY	91
ASN	92
ASN	93
THR	94
LEU	95
PRO	96
ASN	120
VAL	121
HIS	122
SER	123
ASN	124

ES 2 842 425 T3

GLY	125
ASP	130
ASN	131
GLY	132
ALA	133
ALA	134
ASP	137
VAL	138
HIS	139
GLY	140
PHE	141
ASN	142
LYS	143
THR	150
LYS	151
GLY	152
ILE	153
SER	154
PHE	159
ASN	160
TYR	161
ARG	162
THR	163
THR	164
TYR	165
PRO	166
ASP	167
ASP	180
GLN	180
ARG	182
THR	183
LYS	184
TYR	185
LYS	186
GLU	187

GLU	188
VAL	190
GLN	206
MET	262
PHE	263
THR	264
ASN	265
ARG	266
SER	267
GLY	268
SER	269
GLN	270
GLN	271
TRP	272
ARG	273
TRP	288
ARG	289
VAL	290
THR	291
ARG	292
ASN	293
TYR	294
ASP	295
VAL	296
VAL	296
HIS	297
HIS	298
TRP	299
ARG	300

Ejemplo 13: el VJC de LCR y plasma, pero no de orina, de pacientes con LMP, porta mutaciones de VP-1 asociadas a LMP.

- 5 Para investigar si las mutaciones asociadas a la LMP se seleccionan específicamente en el LCR de los pacientes con LMP, se analizaron las secuencias pareadas inicialmente de LCR y orina de 7 pacientes (Tabla 17). En cada paciente, VJC-VP1 de LCR portaba una sustitución de aminoácido que no estaba presente en la secuencia derivada de la orina. Por lo demás, las secuencias de LCR y orina eran idénticas en pacientes individuales y se caracterizaban por polimorfismos idénticos en comparación con la cepa de referencia (mismo subtipo de virus). Las mutaciones en el LCR asociadas a LMP implicaban los codones 55, 60, 267, 269 y también el codón 122. Las secuencias plasmáticas

de VP1, disponibles de 13 pacientes (Tabla 17), eran en todos los casos idénticas a la secuencia correspondiente derivada de LCR, que portaba la misma sustitución asociada a LMP.

Tabla 17. Sustituciones de aminoácidos de VP1 de VJC en secuencias derivadas de muestras pareadas de orina, LCR y plasma de pacientes con LMP

5 Tabla 17.

	Matriz	Subtipo de VJC	Sustitución asociada a LMP
1	Orina	1B	ninguna
	LCR	1B	L55F
	Plasma	n.a.	n.a.
2	Orina	Mad-1	ninguna
	LCR	Mad-1	H122R; A2V
	Plasma	n.a.	n.a.
4	Orina	1A	ninguna
	LCR	1A	H122R
	Plasma	1A	H122R
5	Orina	Mad-1	ninguna
	LCR	Mad-1	S269F
	Plasma	Mad-1	S269F
6	Orina	Indet.	ninguna
	LCR	CONS	S267Y
	Plasma	Indet.	S267Y
7	Orina	1B	ninguna
	LCR	1B	S269F
	Plasma	1B	S269F
8	Orina	1A	ninguna
	LCR	1A	S269F
	Plasma	1A	S269F
9	Orina	n.a.	n.a.
	LCR	Indet.	S269F
	Plasma	Indet.	S269F
10	Orina	n.a.	n.a.
	LCR	2B	S269F
	Plasma	2B	S269F
11	Orina	n.a.	n.a.
	LCR	4v164K	ninguna
	Plasma	4v164K	ninguna
12	Orina	n.a.	n.a.

	Matriz	Subtipo de VJC	Sustitución asociada a LMP
	LCR	1A	L55F
	Plasma	1A	L55F
13	Orina	n.a.	n.a.
	LCR	4v128A345K	L55F
	Plasma	4v128A345K	L55F
14	Orina	n.a.	n.a.
	LCR	1Bv117T	S269F
	Plasma	1Bv117T	S269F
16	Orina	4v164K	ninguna
	LCR	n.a.	n.a.
	Plasma	4v164K	L55F

U, orina; LCR, líquido cefalorraquídeo; P, plasma. * cuando no se identifica ninguna sustitución, el valor de la columna se refiere al no. de clones sin sustitución/no. de clones examinados.

Ejemplo 14: El VJC de LCR de pacientes con LMP porta consistentemente una de varias mutaciones o deleciones localizadas en sitios críticos para la unión celular.

5 Para definir el tipo y la frecuencia de las sustituciones de VP1 asociadas a LMP in vivo, se analizaron las secuencias de VP1 derivadas de LCR en un grupo más grande de pacientes. Se identificó una mutación o delección principal asociada a la LMP en 37 de 40 pacientes (90 %) (Tabla 18). El gen VP1 se clonó y secuenció para varios clones como se describe en Materiales y Métodos. Las mutaciones se identificaron comparando las secuencias con las secuencias de VP1 de muestras de orina pareadas (cuando estaban disponibles) y con 460 secuencias aisladas de la orina de individuos sin LMP (n = 460) como se reporta en el Genbank. En algunos pacientes, se identificó la mutación H122R.

10 En algunos pacientes, se identificó la mutación 283I. En algún paciente, se identificaron las mutaciones A2V. En algún paciente, se identificó la delección 50-51. En algún paciente, se identificó la mutación 50-51. En algún paciente, se identificó la delección 54-55. En algún paciente, se identificó la delección 123-125. En algún paciente, se identificó la delección 125-134. En algún paciente, se identificó la delección 126-134.

15 Los cambios más frecuentes implicaron los codones 55 y 269, cada uno identificado en el 25 % de los pacientes. Además de las sustituciones ya reportadas, en los codones 55, 60, 61 y 265, 267, 269, se identificaron recientemente varias otras mutaciones o deleciones asociadas a LMP, que implican codones de VP1 no polimórficos, como se evidencia en comparación con secuencias derivadas de orina del Genbank. Todas estas mutaciones recientemente identificadas también están localizadas en sitios de unión críticos de VP1 (Tabla 18). La FIG. 20 es un modelo estructural del complejo VP1 de VJC/ tetrasacárido NeuNAc-(a2,3)-Gal-(b1,3)-[(a2,6)-NeuNAc]-Glc-NAc. (A). Se muestran las superficies de cinco cadenas de VP1 de VJC. Se muestra el resto RG esencial para la unión del ácido siálico central. También se muestran residuos mutados asociados a LMP (L55, K60, S265, S269). También se indican mutaciones adicionales exclusivas de las muestras aisladas de LMP (S61, D66, Q271) y (P51, D52, H122, S123, N124, G125, Q126, A127). (B). Una vista de cerca de la FIG. 20A. La ubicación de V296 de VP1 de MPyV, que se prevé que sea equivalente a S269 de VP1 de VJC, se muestra en malla.

25 Tabla 18. Sustituciones y deleciones de aa de VP1 de VJC asociadas a LMP en el LCR de pacientes con LMP

	Subtipo de VP1 de VJC	Sustitución o delección asociada a LMP
1	4v-164K	ninguna
2	1AV-128S	ninguna
4	2B	50-51 del D66G N124S
5	1B	L55F
6	1A	L55F

	Subtipo de VP1 de VJC	Sustitución o delección asociada a LMP
7	3	L55F Q271H
8	1B	L55F
9	1A	L55F
10	4v-128A345K	L55F
16	1B	S61L 54-55 del
18	1A	H122R
19	1A	H122R A2V
17	1B	123-125 del
20	4v-128A	N265D
21	4v-128A	N265D
23	1B	S267F S61L Q271H
24	2B	S267F
25	Indet.	S269F
27	1B	S269F
31	2B	L55F
34	2B	N265H
36	2B	S269F
37	1Bv117T	S269F
38	1B	S269F
39	1A	S269F
Indet., indeterminado; Cons, consenso; v, variante a. secuencia disponible hasta la posición 295		

Ejemplo 15: relación entre el virus JC aislado de diferentes compartimentos

5 Para investigar la relación entre las poblaciones virales en tres compartimentos (riñón, plasma y LCR), se analizó la variación de la población de secuencias de VP1 representadas por clones secuenciados individualmente de los tres compartimentos en tres pacientes. Con la excepción de los cambios de aminoácidos presuntamente asociados con el desarrollo de LMP, los genotipos dominantes de VP1 en los tres compartimentos siempre fueron idénticos. Toda la variación de secuencia observada se debió a variantes de un solo nucleótido de baja frecuencia. Esto sugiere que el virus causante de la LMP se originó a partir de una población residente en el riñón preexistente.

10 La relación entre las poblaciones virales en los tres compartimentos se puede caracterizar por el grado de polimorfismo de baja frecuencia compartido. Se analizaron las variantes de un solo nucleótido observadas en dos o más clones. En los tres pacientes, la mayoría de la variación genética se limitó a compartimentos individuales ya que se observaron variantes alélicas presentes en más de una secuencia en un solo compartimento. Por lo tanto, la población viral está muy estructurada.

15 En dos de los tres pacientes, se compartieron varias variantes alélicas entre las poblaciones de LCR y plasma, y no se compartió ninguna variante entre las poblaciones de LCR y riñón o las poblaciones de plasma y riñón. En cada uno de estos dos pacientes, se observó la misma mutación asociada a LMP en clones de LCR y plasma. Estos datos son consistentes con un solo origen de las poblaciones de LCR y plasma, presumiblemente debido a un escape único de un evento renal. En este escenario, la variación de la secuencia compartida entre las poblaciones de LCR y plasma se originó después de la fijación de la mutación asociada a LMP fuera del riñón (asumiendo que no es probable que se produzcan mutaciones múltiples independientes en el mismo sitio). La variación de la secuencia de VP1 compartida

20

entre las poblaciones de LCR y plasma puede indicar la presencia de migración viral entre compartimentos. También es consistente con un escenario de infección escalonada, donde una población viral residente fuera del riñón se establece primero en un compartimiento (ya sea LCR o plasma), acumula variación genética y luego infecta el segundo compartimento.

- 5 Un tercer paciente presenta una imagen diferente de polimorfismo compartido entre compartimentos. Se compartieron dos variantes entre el LCR y el riñón, se compartieron tres variantes entre el plasma y el riñón y se compartió una variante entre los tres compartimentos. Todos los clones aislados de LCR y la mayoría de los clones aislados de plasma albergaban la misma mutación asociada a LMP (S269F). Sin embargo, tres clones aislados del plasma tenían una mutación diferente asociada a LMP (S267F). Estos clones carecían de la mutación dominante asociada a LMP.
- 10 Aunque no se puede excluir la posibilidad de múltiples infecciones sucesivas de LCR y plasma del Paciente 3, estas observaciones no son necesariamente inconsistentes con el escenario de un solo origen de poblaciones de LCR y riñón después de un único escape del riñón. Los datos del Paciente 3 podrían ser un ejemplo de un barrido selectivo suave. El barrido selectivo suave, a diferencia del barrido selectivo duro, no elimina por completo la variación genética preexistente. El escenario de barrido suave es muy probable si el producto del tamaño efectivo de la población y la
- 15 tasa de mutación ($Ne \times \mu$) es superior a uno. En este caso, es probable que existan múltiples casos de una mutación beneficiosa (o varias mutaciones beneficiosas de ventaja selectiva igual o comparable) en la población original con diferentes fondos haplotípicos. Después de un barrido suave, todas las secuencias albergarían una mutación beneficiosa, pero la población sigue siendo polimórfica. Es posible que existieran múltiples casos de mutación S269F y mutación S267F en la población renal antes del escape y la fijación ocurrió después del escenario de barrido suave
- 20 que condujo a la coexistencia de las variantes de VP1 S269F y S267F en la población plasmática y la variación compartida entre los tres compartimentos.

Ejemplo 16: correlación de diversas mutaciones con el resultado clínico.

- Para evaluar si las sustituciones individuales de VP1 asociadas a LMP podrían ser clínicamente significativas, p. ej., al ser seleccionadas de manera diferente según el paciente y el contexto clínico o asociadas con diferentes resultados
- 25 de la enfermedad, su presencia se correlacionó con una serie de variables.

Se observó que el virus JC sin sustituciones de VP1 o sustituciones que implican las posiciones 122-134 estaba presente a nivel de ADN significativamente más bajo en el LCR en comparación con el virus con sustituciones que implican otras posiciones ($p = 0,013$, ensayo de Mann-Whitney), p. ej., con sustituciones bien en las posiciones 50-61 ($p = 0,02$) o 265-269 ($p = 0,036$) que portan diferentes sustituciones de VP1.

- 30 Ejemplo 17: la mutación asociada a LMP disminuye la capacidad de VP1 para hemaglutinar los RBC.

Con el fin de comprender el papel que desempeñan las mutaciones asociadas a la LMP en la patogénesis de la enfermedad, se investigó el efecto de algunas de estas mutaciones sobre la unión al receptor viral. Dado que se sabe que el VJC se une a las estructuras del ácido siálico (Liu), la capacidad viral para provocar la hemaglutinación de los RBC que expresan esas estructuras se ha usado ampliamente como modelo para la interacción viral con su receptor.

- 35 Las partículas similares a virus (VLP) preparadas a partir de la principal proteína de la cápside de VJC, VP1, se han usado ampliamente como un buen modelo para investigar las interacciones de los poliovirus con sus receptores celulares. De manera similar a la cápside viral, las VLP forman la estructura de la cápside viral como se evidencia en el microscopio electrónico (datos no mostrados). A continuación, se investigó la unión de las VLP preparadas a partir de molécula de "tipo salvaje" o de diversas moléculas de VP1 "mutantes". Se introdujeron una serie de mutaciones
- 40 asociadas a LMP que se mostraron que se seleccionaban positivamente durante la LMP como mutaciones puntuales en un núcleo de una molécula de VP1 de un único fondo viral (VJC tipo 3) y se comparó su capacidad para hemaglutinar (p. ej., unirse a) glóbulos rojos (RBC). Las VLP preparadas a partir de la molécula VP1 del virus tipo 3 al igual que las VLP preparadas a partir del virus tipo 1A (p. ej., Mad-1) pueden causar hemaglutinación de RBC, y lo hacen a la concentración tan baja como 760 pg/ml. Si embargo, las VLP que portan una de las mutaciones que ocurre más
- 45 frecuentemente, 55F, 267F, y mutaciones en la posición 269 (F o Y) no causaron hemaglutinación incluso a la concentración más alta ensayada de 100 µg/ml, que corresponde a una disminución de más de 100.000 veces en la actividad. La hemaglutinación era todavía aparente con las VLP mutantes 60E, 265D y 271H, pero solo a concentraciones muy altas que correspondieron a pérdidas de 200 a 25.000 veces en la actividad. Solo la unión de VLP mutante 66H no se vio fuertemente afectada y mostró solo una disminución de 3 veces en la hemaglutinación
- 50 (3.000 pg/ml como la concentración hemaglutinante más baja). No se observaron mutaciones 66H ni 271H entre las secuencias analizadas en este ejemplo, pero se identifica que estas mutaciones están asociadas a LMP, tomando como base un análisis de secuencias de Genbank. Este efecto de las mutaciones sobre la capacidad de las VLP para causar hemaglutinación sugiere que las mutaciones pueden cambiar la especificidad del receptor viral al anular la capacidad del virus para unirse a los receptores celulares.

- 55 Ejemplo 18: las mutaciones asociadas a LMP pierden la capacidad de hemaglutinar RBC de diferentes grupos sanguíneos

Las VLP que portan mutaciones asociadas a la LMP pierden la capacidad de hemaglutinar RBC de diferentes grupos sanguíneos. Para el ensayo de hemaglutinación, se incubaron glóbulos rojos (RBC) con diluciones seriadas de dos

veces de varias VLP empezando a partir de 100 µg/ml. La concentración mínima de HA es la concentración más baja de proteína VLP que aún aglutina los RBC. La hemaglutinación se examinó mediante inspección visual como se ha descrito anteriormente. Todas las reacciones de hemaglutinación se realizaron por duplicado. La media +/- SD para la concentración mínima de HA se calcula tomando como base los resultados de hemaglutinación de cuatro donantes de grupos sanguíneos diferentes A, B, O y AB. Las VLP que mostraron la concentración de hemaglutinación más baja de 100 µg/ml no causaron hemaglutinación a la concentración de VLP más alta ensayada (p. ej., 100 µg/ml).

Ejemplo 19: las mutaciones asociadas a LMP cambian la especificidad de gangliósido de VP1.

Con el fin de diseccionar adicionalmente la especificidad del receptor de VP1 de VJC, se investigó la unión de varias VLP mutantes a diferentes gangliósidos. Los gangliósidos son un grupo de glicoesfingolípidos complejos en los que las cadenas de oligosacáridos que contienen uno o más ácidos siálicos (ácido N-acetilneuramínico, NeuNAc) están unidas a una ceramida, que ancla la estructura a la membrana celular. La unión de VLP a estos gangliósidos se midió en formato de ELISA, donde los gangliósidos se usaron para recubrir placas de ELISA de forma similar al antígeno y seguido de la adición de VLP, cuya unión se detectó con anticuerpos monoclonales específicos de VP1. Usando una VLP de VJC de tipo 3 "de tipo salvaje", se observó la unión más fuerte a GD1b, GD2 y GT1a, con un aumento de la señal de más de 8-12 veces en comparación con el fondo producido por la unión de VLP al pocillo sin ningún gangliósido (FIG. 21). Las mutaciones de VP1 específicas de LMP anulan o cambian drásticamente la especificidad de la proteína de la cápside viral VP1 por los gangliósidos sialilados. La unión de las VLP a una serie de gangliósidos recubiertos en una placa de 96 pocillos se detectó con un proceso de dos etapas que implica la detección de las VLP unidas a un gangliósido con anticuerpos murinos específicos de VP1 y anticuerpos anti-IgG murinos marcados con HRP seguido de revelado con disolución TMB. La unión de VLP a un gangliósido específico se calculó como el porcentaje de aumento de la densidad óptica obtenida con la VLP específica presente en relación con la obtenida sin VLP y anticuerpos solos en presencia del mismo gangliósido, $100 * (DO_{450}(\text{más VLP}) - DO_{450}(\text{menos VLP})) / DO_{450}(\text{menos VLP})$. Se muestra que la estructura esquemática del gangliósido para revelar la estructura de unión del núcleo unida por varias VLP. Se muestra un experimento representativo de cuatro realizados. Esta especificidad de gangliósido es consistente con lo que se describió previamente para el virus Mad-1 "de tipo salvaje" de tipo 1A. La unión de las VLP a asialo-GM1 y GD1a fue mucho más débil pero aún significativa con respecto al fondo, mientras que la unión a otros gangliósidos fue muy insignificante en relación con el fondo sin gangliósidos. Según el patrón de unión, parece que la estructura principal "de núcleo" unida por el virus de tipo salvaje consiste en una estructura de tetrasacárido GalNAc(β1-4)[Neu5Ac(α2-8)-Neu5Ac(α2-3)] Gal(β1-4)Glc, siendo un resto de ácido di-siálico de Neu5Ac(β2-8)-Neu5Ac(α2-3) crucial para la unión.

Sin embargo, la unión de todas las VLP mutantes fue drásticamente diferente de la molécula de "tipo salvaje". Específicamente, como se ve en la FIG. 21, los mutantes de VLP 55F, 60E, 267F, 269F y 269Y perdieron completamente la unión a todos los gangliósidos sialilados mientras todavía mostraban una unión inalterada a la estructura de GM1 asialilado (p. ej., asialo-GM1). Aún así, otros, tales como 66H, 265H y 271H mostraron un rango mucho más amplio de unión a gangliósidos que la molécula de VLP original no mutada.

Ejemplo 20: unión de VLP a varias dianas celulares.

Los resultados de la hemaglutinación y los ensayos de unión directa de gangliósidos sugieren conjuntamente que las mutaciones asociadas a LMP cambian la especificidad del receptor viral y especialmente la capacidad viral para unirse a estructuras de oligosacáridos sialilados. Por lo tanto, se investigó a continuación cómo estos cambios conferidos por mutaciones en la unión del receptor específico afectaban la capacidad del VJC para unirse a sus supuestas células diana. Se midió la unión de las VLP de tipo salvaje y mutante anteriores a los tres tipos de células principales que se informó que son importantes para el ciclo celular viral: células epiteliales de riñón, linfocitos y células del SNC. Se eligieron células epiteliales del túbulo proximal renal humano (HRPTEC) primarias como células del sitio de persistencia viral asintomática del virus no mutado. También se eligieron linfocitos B humanos primarios, como el tipo de célula que se había sugerido que era crítico para la diseminación viral desde el sitio periférico al SNC, así como otras células linfoides, p. ej., linfocitos T primarios y la línea celular linfocítica Jurkat. Aunque no se ha demostrado de forma inequívoca la infección productiva de las células linfoides, se ha mostrado que los linfocitos se unen al VJC a través de sus estructuras de ácido siálico (Atwood et al.) y, por lo tanto, podrían potencialmente portar el virus in vivo. Los astrocitos fetales humanos primarios y la línea de células gliales humanas SVG-A también se emplearon como tipo de célula modelo para la infección del SNC durante la LMP. La infección de astrocitos ha sido bien documentada en pacientes con LMP y ambos tipos de células gliales pueden infectarse con VJC in vitro.

Los mutantes de VP1 que producen LMP pierden la capacidad de unión a las células renales y sanguíneas, pero se unen a las células gliales. La línea de células gliales SVG-A(A), astrocitos humanos primarios (B), células endoteliales microvasculares del cerebro humano (C), células epiteliales tubulares renales (D) o células mononucleares de sangre periférica (E y F) se incubaron primero con diferentes VLP (como se indica en el eje x) y luego se incubaron con anticuerpos anti-VP1 seguido de tinción con anticuerpos marcados con fluorescencia. Se evaluó la unión de las VLP a los linfocitos T (E) y B (E) después de la cotinción de las PBMC con anticuerpos específicos para los marcadores CD3 y CD20 humanos y la activación de la población correspondiente. La relación de la intensidad fluorescente media (MFI) de las células teñidas con anticuerpos anti-VP1 en presencia de las VLP en relación con la MFI de fondo de las células teñidas solo con los anticuerpos de detección en ausencia de VLP se representa gráficamente para cada VLP. La relación media de MFI +/-SD se calcula tomando como base los resultados de varios experimentos independientes

(N se indica en el gráfico). Las VLP preparadas a partir de VP1 de "tipo salvaje" se unieron fuertemente a todos los tipos de células anteriores con MFI de más de 2 veces sobre la tinción de fondo. Sin embargo, la unión de las VLP mutantes dependía tanto del tipo de célula como de la posición del aminoácido mutado. Específicamente, las mutaciones más frecuentes asociadas a LMP, 55F, 267F, 269F y 269Y, anulaban la unión de las VLP a las células epiteliales tubulares del riñón y a todas las células linfocíticas, pero no a los astrocitos primarios o la línea celular glial SVG-A. Ambos tipos de células del SNC todavía se unieron fuertemente a las VLP que portan estas mutaciones (con la excepción de 55F que se une a células SVG-A, pero no a astrocitos primarios). Las VLP que portan 60E, 66H y 271H todavía se unieron a todos los tipos de células, incluyendo las células epiteliales de riñón y los linfocitos, aunque la unión de 271H estaba fuertemente disminuida.

5 Ejemplo 21: las VLP que portan mutaciones asociadas a LMP se unen a las células gliales de forma independiente del ácido siálico.

Dado que se ha demostrado previamente que la unión del virus a las células es dependiente del ácido siálico (p.ej., Atwood et al), pero los datos demuestran que la mayoría de las mutaciones asociadas a LMP anulan la unión de las VLP a los gangliósidos que contienen ácido siálico, se ensayó a continuación si la unión de las VLP mutantes a las células seguía siendo dependiente del ácido siálico. Para ello, se trataron células SVG-A o Jurkat con neuraminidasa para eliminar el ácido siálico de la superficie celular. La tinción de las células con lectinas específicas para varias conformaciones de ácidos neuramínicos (p. ej., lectina de Sambucus Nigra (SNA) y lectina de Maackia amurensis (MAA)) demostró la eficacia del tratamiento con neuraminidasa en la eliminación del ácido siálico. La unión de mutantes de VP1 que producen LMP a células gliales es independiente del ácido siálico. Las células de la línea celular glial SVG-A o la línea celular linfocida Jurkat se pretrataron primero bien con a2-3,6 neuraminidasa durante 60 min a 20 37 °C o se trataron de forma simulada seguido de incubación a 4 °C con la VLP indicada y tinción con los anticuerpos de detección como se describe en la presente memoria.

La unión de las VLP de tipo salvaje de tipo 3 a las células SVG-A y Jurkat depende del ácido siálico, lo que confirma lo que se mostró anteriormente para el virus Mad-1 (p. ej., el tipo 1A de tipo salvaje). Sin embargo, la unión de todas las VLP mutantes ensayadas excepto K60E a las células SVG-A no se vio afectada por el tratamiento con neuraminidasa, lo que sugiere que la unión de estos mutantes a estas células es independiente del ácido siálico. De forma interesante, los mutantes que todavía eran capaces de unirse a células Jurkat (p. ej., K60E, D66H, N265D y Q271H) se unían de una manera dependiente del ácido siálico como se evidencia por la unión disminuida a las células Jurkat tratadas con la neuraminidasa.

30 Como se puede ver en la Tabla de resumen 19, la unión de las VLP a las células Jurkat parece estar mediada en gran parte por ácido siálico, por lo que las VLP mutantes que no muestran ninguna unión a los gangliósidos sialilados no se unen a las células Jurkat y las que lo hacen también se unen a las células Jurkat en forma dependiente del ácido siálico. Una excepción notable a esta observación es el mutante N265D, que, tomando como base la unión directa a los gangliósidos, parecía haber ganado una unión muy amplia al ácido siálico, pero aún así perdió su unión a la célula Jurkat. Tomando como base los resultados anteriores, parece que los resultados de la unión de VLP están en línea con la unión de VLP a los RBC según se juzga a partir de los resultados de hemaglutinación.

En resumen, parece que las mutaciones asociadas a la LMP suprimen en gran medida la unión del virus dependiente del ácido siálico a muchos tipos diferentes de células periféricas, incluyendo los RBC, las células epiteliales tubulares renales y las células linfoides. La unión del virus mutante a las células gliales específicas del SNC parece no verse afectada en gran medida y es independiente del ácido siálico.

Tabla 19. Correlación de la unión de las VLP entre diversos ensayos

	HA	SA	HRPTEC	Jurkat	Astrocitos	SVG-A	Dependiente de AS	
							Jurkat	SVG-A
Tipo Salvaje 3	+++	++	+++	+++	+++	+++	SÍ	SÍ
L55F	-	-	-	-	+/-	+++	NO	NO
K60E	-	-	+++	++	++++	+++	SÍ	Parc.
D66H	++	+++	+++	+++	+++++	+++	Parc.	NO
N265D	+	++++	-	-	+++	++++	NO	NO
S267F	-	-	-	-	++	++	NO	NO
S269F	-	-	-	-	++	+++	NO	NO
S269Y	-	-	-	-	++	+++++	NO	NO
Q271H	+/-	+++	+	+	+++	+++++	SÍ	NO

Los siguientes métodos y materiales se usaron en conexión con los ejemplos 13-21:

Pacientes y muestras

5 El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Institución. Para investigar la presencia y la evolución de las mutaciones asociadas a LMP in vivo, de una gran cohorte de pacientes con LMP, seguidos en el Departamento de Enfermedades Infecciosas del Hospital San Raffaele entre 1992 y 2009, inicialmente se seleccionaron 40 pacientes de los cuales estaban disponibles muestras pareadas de LCR, plasma u orina y contenían ADN de VJC según lo determinado por PCR en tiempo real (Bossolasco). La VP1 se amplificó finalmente a partir de al menos dos tipos diferentes de muestras en 14 de estos pacientes.

10 Posteriormente, se seleccionaron 43 pacientes con LMP adicionales con solo LCR disponible y ADN de VJC detectado en LCR mediante PCR en tiempo real. La VP1 de VJC se amplificó con éxito en 28 de estos pacientes. Por lo tanto, se pudieron estudiar muestras pareadas de 14 pacientes y secuencias derivadas de LCR de un total de 40 pacientes.

PCR de VP1 de VJC

Extracción de ADN y amplificación de VP1

15 Se extrajo ADN de 200 µL de LCR, plasma u orina usando el Kit QIAamp Blood (Qiagen) y se eluyó en un volumen final de 50 µL. La VP1 se amplificó usando cebadores que flanqueaban todo el gen VP1 (PCR de VP1 completo) o, cuando la amplificación con este método no tuvo éxito, mediante un ensayo de PCR semianidada que amplificó separadamente regiones de VP1 más cortas (PCR de fragmento corto de VP1).

20 La PCR de VP1 completa consistió en un ensayo anidado que usó los cebadores externos VP1-LF y VP1-LR, que amplifican un fragmento de 2.027 pb; y los cebadores internos VP1-SF y VP1-SR, que amplifican un fragmento de 1.233 pb de longitud. La mezcla de las reacciones de PCR consistió en 5 µL de tampón de PCR 10X, 4 mM de cada dNTP, 0,7 µM de cebadores VP1-LF y VP1-LR en la primera ronda y cebadores VP1-SF y VP1-SR en la segunda ronda, 1,25 unidades de Platinum Taq HF (Invitrogen) y 1 µL de ADN extraído (primera ronda) o 2,5 µl de producto amplificado (segunda ronda) en un volumen total de 50 µL. Los parámetros del ciclado fueron (tanto para la primera como para la segunda ronda) 30 ciclos a 94 °C durante 20 segundos, a 58 °C durante 30 segundos y a 68 °C durante 90 segundos en un termociclador automático (Applied Biosystems).

30 El fragmento corto de PCR consistió en una PCR semianidada que usó los cebadores VP1-1 y VP1-4a en la primera ronda, que amplifican un fragmento de 797 pb, seguido de dos ensayos semianidados con los cebadores VP1-1 y VP1-2a, que amplifican un fragmento de 481 pb de longitud, o con los cebadores VP1-1,5 y VP1-4a, que amplifican un fragmento de 490 pb de longitud (Zheng) (Tabla 20). La mezcla de las reacciones de PCR consistió en 2,5 µL de tampón de PCR 10X, 200 µM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, cebadores 0,5 µM y 1,25 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems). En la primera ronda, se añadieron 4 µL de ADN extraído en un volumen total de 25 µL y los parámetros del ciclado fueron 20 ciclos a 94 °C durante 20 segundos, a 55 °C durante 30 segundos y a 68 °C durante 90 segundos en un termociclador automático (Applied Biosystems). Este producto de PCR de primera etapa se purificó con el kit de limpieza de PCR ExoSAP-IT, el protocolo consiste en una sola etapa de pipeteo (adición de mezcla de enzimas), una incubación de 30 minutos a 37 °C seguida de inactivación de enzimas a 80 °C durante 15 min adicionales. En la segunda ronda de la PCR semianidada, se añadieron 4 µL de producto de PCR limpiado en un volumen total de 25 µL y los parámetros del ciclado fueron 40 ciclos a 94 °C durante 20 segundos, a 62 °C durante 30 segundos y a 68 °C durante 90 segundos en un termociclador automático (Applied Biosystems).

45 Con ambos ensayos, después de la amplificación con los cebadores internos, se sometieron a electroforesis 10 µl del producto amplificado de la segunda mezcla en un gel de agarosa al 2 % que contenía 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Los resultados se fotografiaron bajo iluminación U.V. y se consideraron positivos cuando estaba presente una banda correspondiente al fragmento de ADN con la longitud de pb esperada.

Tabla 20. Secuencias de nucleótidos de los cebadores usados en la PCR anidada de longitud completa y la PCR semianidada de fragmentos cortos para VJC-VP1

Nombre	Secuencia	Número Nt. *
VP1-LF	GCAGCCAGCTATGGCTTTAC	(SEQ ID NO: 55)
VP1-LR	GCTGCCATTCATGAGAGGAT	(SEQ ID NO: 56)
VP1-SF	CCTCAATGGATGTTGCCTTT	(SEQ ID NO: 57)
VP1-SR	AAAACCAAAGACCCCT	(SEQ ID NO: 58)

Nombre	Secuencia	Número Nt. *
VP1-1	TTGACTCAATTACAGAGGTAGAAT	(SEQ ID NO: 59)
VP1-4a	AGAAATTGGGTAGGGGTTTTTAAC	(SEQ ID NO: 60)
VP1-2a	AGGTACGCCTTGTGCTCTGTGTTC	(SEQ ID NO: 61)
VP1-1.5	GTGCAGGGCACCAGCTTTCATT	(SEQ ID NO: 62)

* según la cepa Mad-1 (ref)

Clonación y secuenciación por PCR de VP1

5 El producto de la amplificación se purificó mediante el kit de purificación de Qiagen. Se añadieron A a los extremos del producto de PCR limpiado mediante la Taq polimerasa (reacción de protuberancia de A) y la clonación se llevó a cabo mediante el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen). Se preparó ADN en minipreparación (Qiagen) a partir de colonias que contenían el producto de PCR de VP1 clonado. Se secuenciaron de dos a 48 clones para cada muestra (mediana 23). Después de la traducción de las secuencias de VP1, las mutaciones de aminoácidos se marcaron por comparación con la gran selección de secuencias de VP1 de los casos de LMP y no LMP. Solo se consideraron las mutaciones presentes en más de un clon por muestra.

10 PCR en tiempo real para la cuantificación de VJC-ADN

El ADN de VJC se cuantificó en muestras de LCR, plasma y orina mediante PCR en tiempo real, como se ha descrito anteriormente (Bossolasco S. et al. 2005)

Ensayo de hemaglutinación

15 Se lavaron dos veces glóbulos rojos (RBC) de donantes de tipo O+ y se suspendieron en tampón de Alsever (citrato de sodio 20 mM, NaCl 72 mM, glucosa 100 mM, pH 6,5 ajustado con ácido acético) a una concentración final del ~0,5 %. Se prepararon diluciones seriadas de dos veces empezando a partir de 100 µg/ml de VLP en tampón de Alsever y se añadió un volumen igual de RBC en cada pocillo de una placa de microtitulación de fondo en "U" de 96 pocillos y se incubó a 4 oC durante 3-6 horas (se realizaron 24 diluciones de dos veces). La concentración mínima de HA es la concentración más baja de proteína VLP que aún aglutina los RBC.

20 ELISA de gangliósidos

25 Se usaron gangliósidos específicos (resuspendidos en metanol) para recubrir una placa de microtitulación (10 µg) toda la noche. Las placas se bloquearon (BSA al 1 % (Fracción V), Tween-20 al 0,1 %, PBS con Ca++, Mg++). Se prepararon las VLP a 30 µg/ml en tampón de bloqueo y se añadieron (100 µl/pocillo). Todas las incubaciones se realizaron en hielo. Después de 90 minutos, las placas se lavaron con tampón de bloqueo. La unión de VLP se detectó con un proceso de dos etapas que implicaba la unión de anti-VP1 (PAB597 a 2 µg/ml) y HRP-anti-mIgG (1:100). Las placas se lavaron y revelaron con disolución TMB Turbo ELISA. La reacción se paró con ácido y la placa se leyó en un espectrofotómetro a 450 nm.

Análisis por citometría de flujo de la unión de VLP a las células

30 Las células se despegaron y se recogieron (SVG-A, Jurkat, Astrocitos humanos, Epiteliales Tubulares Proximales Renales Humanas). Primero, se incubó una muestra (1-5 x 10⁵ células) con VLP (10-30 µg/ml) en tampón FACS (BSA al 1% [Fracción V], azida sódica 2 mM, PBS con Ca ++, Mg ++) en un volumen de 50 µl durante 60 - 90 minutos en hielo. Las células se lavaron con tampón FACS y se incubaron adicionalmente con anti-VPI (PAB597 2 µg/ml) durante 60 minutos, seguido de lavado e incubación con AlexaFluor488-anti-mIgG (1:100) durante otros 30-45 minutos. Las células se lavaron y fijaron en Cytifix/Cytoperm durante 20 minutos, seguido de un lavado final y resuspensión en tampón FACS. Las células se analizaron en un BD FACSCalibur. Controles apropiados y tinción con otros anticuerpos (control de isotipo, GM1, asialo GM1, GD1a, GT1b) y lectinas (Aglutinina de Cacahuete (PNA), Lectina de Sambucus Nigra (SNA), Lectina II de Maackia Amurensis (Mal II)) cuando sea necesario. En algunos casos, las células se pretrataron con α-2-3 neuraminidasa, α-2-3,6 neuraminidasa o PNGasaF para alterar sus estructuras de azúcar en la superficie celular.

40 La memoria descriptiva escrita anteriormente se considera suficiente como para permitir que un experto en la técnica ponga en práctica la invención. El alcance de la presente invención no debe limitarse por los ejemplos proporcionados, ya que los ejemplos pretenden ser una ilustración única de un aspecto de la invención y otras realizaciones funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. Diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en la presente memoria resultarán evidentes para los expertos en la técnica a

partir de la descripción anterior y se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Las ventajas y los objetos de la invención no están necesariamente englobados por cada realización de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BIOGEN IDEC MA INC.
5 LUGOVSKOY, ALEXEY
GORELIK, LEONID
<120> MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DEL POLIOMAVIRUS JC
<130> B1152.70009
<140> TODAVÍA NO ASIGNADA
10 <141> 05-02-2010
<150> US 61/150.310
<151> 05-02-2009
<160> 62
<170> PatentIn versión 3.5
15 <210> 1
<211> 354
<212> PRT
<213> Virus JC
<400> 1

ES 2 842 425 T3

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Arg Lys Asp Pro Val Gln Val
 1 5 10 15

Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
 20 25 30

Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
 35 40 45

Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile
 50 55 60

Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Lys Asp Met Leu Pro Cys
 65 70 75 80

Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
 85 90 95

Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
 100 105 110

Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Thr
 115 120 125

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

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

Tyr Arg Thr Thr Tyr Pro Asp Gly Thr Ile Phe Pro Lys Asn Ala Thr

ES 2 842 425 T3

165 170 175
Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His Lys Ala Tyr Leu Asp Lys
180 185 190
Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val Pro Asp Pro Thr Arg Asn
195 200 205
Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr Gly Gly Glu Asn Val Pro
210 215 220
Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu
225 230 235
Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp Asn Leu Tyr Leu Ser Ala
245 250 255
Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg Ser Gly Ser Gln Gln Trp
260 265
Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln Leu Arg Lys Arg Arg Val
275 280 285
Lys Asn Pro Tyr Pro Ile Ser Phe Leu Leu Thr Asp Leu Ile Asn Arg
290 295 300
Arg Thr Pro Arg Val Asp Gly Gln Pro Met Tyr Gly Met Asp Ala Gln
305 310 315 320
Ile Glu Glu Val Arg Val Phe Glu Gly Thr Glu Gln Leu Pro Gly Asp
325 330 335
Pro Asp Met Met Arg Tyr Val Asp Arg Tyr Gly Gln Leu Gln Thr Lys
340 345 350

Met Leu

<210> 2

<211> 349

<212> PRT

5 <213> Virus de Simio 40

<400> 2

Pro Lys Lys Pro Lys Glu Pro Val Gln Val Pro Lys Leu Val Ile Lys
1 5 10 15
Gly Gly Ile Glu Val Leu Gly Val Lys Thr Gly Val Asp Ser Phe Thr
20 25 30
Glu Val Glu Cys Phe Leu Asn Pro Gln Met Gly Asn Pro Asp Glu His
35 40 45

ES 2 842 425 T3

Gln Lys Gly Leu Ser Lys Ser Leu Ala Ala Glu Lys Gln Phe Thr Asp
50 55 60

Asp Ser Pro Asp Lys Glu Gln Leu Pro Cys Tyr Ser Val Ala Arg Ile
65 70 75 80

Pro Leu Pro Asn Ile Asn Glu Asp Leu Thr Cys Gly Asn Ile Leu Met
85 90 95

Trp Glu Ala Val Thr Val Lys Thr Glu Val Ile Gly Val Thr Ala Met
100 105 110

Leu Asn Leu His Ser Gly Thr Gln Lys Thr His Glu Asn Gly Ala Gly
115 120 125

Lys Pro Ile Gln Gly Ser Asn Phe His Phe Phe Ala Val Gly Gly Glu
130 135 140

Pro Leu Glu Leu Gln Gly Val Leu Ala Asn Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro
145 150 155 160

Ala Gln Thr Val Thr Pro Lys Asn Ala Thr Val Asp Ser Gln Gln Met
165 170 175

Asn Thr Asp His Lys Ala Val Leu Asp Lys Asp Asn Ala Tyr Pro Val
180 185 190

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

Gly Thr Tyr Thr Gly Gly Glu Asn Val Pro Pro Val Leu His Ile Thr
210 215 220

Asn Thr Ala Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu Gln Gly Val Gly Pro Leu
225 230 235 240

Cys Lys Ala Asp Ser Leu Tyr Val Ser Ala Asp Val Asp Ile Cys Gly
245 250 255

Leu Phe Thr Asn Thr Ser Gly Thr Gln Gln Trp Lys Gly Leu Pro Arg
260 265 270

Tyr Phe Lys Ile Thr Leu Arg Lys Arg Ser Val Lys Asn Pro Tyr Pro
275 280 285

Ile Ser Phe Leu Leu Ser Asp Leu Ile Asn Arg Arg Thr Gln Arg Val
290 295 300

Asp Gly Gln Pro Met Ile Gly Met Ser Ser Gln Val Glu Glu Val Arg
305 310 315

Val Tyr Glu Asp Thr Glu Glu Leu Pro Gly Asp Pro Asp Met Ile Arg
325 330 335

Tyr Ile Asp Glu Phe Gly Gln Thr Thr Thr Arg Met Gln
340 345

<210> 3

<211> 133

ES 2 842 425 T3

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 3

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

5

<210> 4

<211> 133

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 4

ES 2 842 425 T3

Asn Val Pro Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr Thr Val Leu
 1 5 10 15

Leu Asp Glu Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp Asn Leu Tyr
 20 25 30

Leu Ser Ala Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg Ser Gly Ser
 35 40 45

Gln Gln Trp Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln Leu Arg Lys
 50 55 60

Arg Arg Val Lys Asn Pro Tyr Pro Ile Ser Phe Leu Leu Thr Asp Leu
 65 70 75 80

Ile Asn Arg Arg Thr Pro Arg Val Asp Gly Gln Pro Met Tyr Gly Met
 85 90 95

Asp Ala Gln Val Glu Glu Val Arg Val Phe Glu Gly Thr Glu Glu Leu
 100 105 110

Pro Gly Asp Pro Asp Met Met Arg Tyr Val Asp Arg Tyr Gly Gln Leu
 115 120 125

Gln Thr Lys Met Leu
 130

<210> 5

5

<211> 354

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 5

ES 2 842 425 T3

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Arg Lys Asp Pro Val Gln Val
 1 5 10 15

Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
 20 25 30

Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
 35 40 45

Gly Asp Pro Asp Glu His Phe Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile
 50 55 60

Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Lys Asp Met Leu Pro Cys
 65 70 75 80

Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
 85 90 95

Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
 100 105 110

Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Ala
 115 120 125

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

ES 2 842 425 T3

130				135				140							
Phe 145	Ser	Val	Gly	Gly	Glu 150	Ala	Leu	Glu	Leu	Gln 155	Gly	Val	Val	Phe	Asn 160
Tyr	Arg	Thr	Lys	Tyr 165	Pro	Asp	Gly	Thr	Ile 170	Phe	Pro	Lys	Asn	Ala	Thr 175
Val	Gln	Ser	Gln 180	Val	Met	Asn	Thr	Glu 185	His	Lys	Ala	Tyr	Leu	Asp	Lys 190
Asn	Lys	Ala 195	Tyr	Pro	Val	Glu	Cys 200	Trp	Val	Pro	Asp	Pro	Thr	Arg	Asn
Glu	Asn 210	Thr	Arg	Tyr	Phe	Gly 215	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly 220	Glu	Asn	Val	Pro
Pro 225	Val	Leu	His	Ile	Thr 230	Asn	Thr	Ala	Thr	Thr 235	Val	Leu	Leu	Asp	Glu 240
Phe	Gly	Val	Gly	Pro 245	Leu	Cys	Lys	Gly	Asp 250	Asn	Leu	Tyr	Leu	Ser	Ala 255
Val	Asp	Val	Cys 260	Gly	Met	Phe	Thr	Asn 265	Arg	Ser	Gly	Ser	Gln 270	Gln	Trp
Arg	Gly	Leu 275	Ser	Arg	Tyr	Phe	Lys 280	Val	Gln	Leu	Arg	Lys 285	Arg	Arg	Val
Lys	Asn 290	Pro	Tyr	Pro	Ile	Ser 295	Phe	Leu	Leu	Thr	Asp 300	Leu	Ile	Asn	Arg
Arg 305	Thr	Pro	Arg	Val	Asp 310	Gly	Gln	Pro	Met	Tyr 315	Gly	Met	Asp	Ala	Gln 320
Val	Glu	Glu	Val	Arg 325	Val	Phe	Glu	Gly	Thr 330	Glu	Glu	Leu	Pro	Gly 335	Asp
Pro	Asp	Met	Met 340	Arg	Tyr	Val	Asp	Arg 345	Tyr	Gly	Gln	Leu	Gln 350	Thr	Lys
Met Leu															
<210> 6															
<211> 354															
<212> PRT															
<213> Virus JC															
<400> 6															
Met 1	Ala	Pro	Thr	Lys 5	Arg	Lys	Gly	Glu	Arg 10	Lys	Asp	Pro	Val	Gln 15	Val

5

ES 2 842 425 T3

Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
 20 25 30
 Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
 35 40 45
 Gly Asp Pro Asp Glu His Phe Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile
 50 55 60
 Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Lys Asp Met Leu Pro Cys
 65 70 75 80
 Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
 85 90 95
 Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
 100 105 110
 Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Thr
 115 120 125
 His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln Gly Thr Ser Phe His Phe
 130 135 140
 Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu Gln Gly Val Val Phe Asn
 145 150 155 160
 Tyr Arg Thr Thr Tyr Pro Asp Gly Thr Ile Phe Pro Lys Asn Ala Thr
 165 170 175
 Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His Lys Ala Tyr Leu Asp Lys
 180 185 190
 Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val Pro Asp Pro Thr Arg Asn
 195 200 205
 Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr Gly Gly Glu Asn Val Pro
 210 215 220
 Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu
 225 230 235 240
 Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp Asn Leu Tyr Leu Ser Ala
 245 250 255
 Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg Ser Gly Ser Gln Gln Trp
 260 265 270
 Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln Leu Arg Lys Arg Arg Val
 275 280 285

ES 2 842 425 T3

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

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

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

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

Met Leu

<210> 7

<211> 354

<212> PRT

5 <213> Virus JC

<400> 7

ES 2 842 425 T3

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Arg Lys Asp Pro Val Gln Val
 1 5 10 15

Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
 20 25 30

Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
 35 40 45

Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile
 50 55 60

Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Lys Asp Met Leu Pro Cys
 65 70 75 80

Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
 85 90 95

Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
 100 105 110

Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Ala
 115 120 125

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

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

ES 2 842 425 T3

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

Met Leu

<210> 8

<211> 354

<212> PRT

5

<213> Virus JC

<400> 8

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Arg Lys Asp Pro Val Gln Val
 1 5 10 15

Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
 20 25 30

ES 2 842 425 T3

Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
 35 40 45
 Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile
 50 55 60
 Ser His Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Arg Asp Met Leu Pro Cys
 65 70 75 80
 Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
 85 90 95
 Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
 100 105 110
 Ile Gly Val Thr Ser Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Thr
 115 120 125
 His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln Gly Thr Ser Phe His Phe
 130 135 140
 Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu Gln Gly Val Leu Phe Asn
 145 150 155 160
 Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile Phe Pro Lys Asn Ala Thr
 165 170 175
 Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His Lys Ala Tyr Leu Asp Lys
 180 185 190
 Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val Pro Asp Pro Thr Arg Asn
 195 200 205
 Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr Gly Gly Glu Asn Val Pro
 210 215 220
 Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu
 225 230 235 240
 Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp Asn Leu Tyr Leu Ser Ala
 245 250 255
 Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg Ser Gly Ser Gln Gln Trp
 260 265 270
 Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln Leu Arg Lys Arg Arg Val
 275 280 285
 Lys Asn Pro Tyr Pro Ile Ser Phe Leu Leu Thr Asp Leu Ile Asn Arg
 290 295 300

ES 2 842 425 T3

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

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

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

Met Leu

<210> 9

<211> 354

<212> PRT

5 <213> Virus JC

<400> 9

ES 2 842 425 T3

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Arg Lys Asp Pro Val Gln Val
 1 5 10 15
 Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
 20 25 30
 Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
 35 40 45
 Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile
 50 55 60
 Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Lys Asp Met Leu Pro Cys
 65 70 75 80
 Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
 85 90 95
 Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
 100 105 110
 Ile Gly Val Thr Ser Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Thr
 115 120 125
 His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln Gly Thr Ser Phe His Phe
 130 135 140
 Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu Gln Gly Val Leu Phe Asn
 145 150 155 160
 Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile Phe Pro Lys Asn Ala Thr
 165 170 175
 Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His Lys Ala Tyr Leu Asp Lys

ES 2 842 425 T3

180					185					190					
Asn	Lys	Ala	Tyr	Pro	Val	Glu	Cys	Trp	Val	Pro	Asp	Pro	Thr	Arg	Asn
		195					200					205			
Glu	Asn	Thr	Arg	Tyr	Phe	Gly	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly	Glu	Asn	Val	Pro
	210					215					220				
Pro	Val	Leu	His	Ile	Thr	Asn	Thr	Ala	Thr	Thr	Val	Leu	Leu	Asp	Glu
225					230					235					240
Phe	Gly	Val	Gly	Pro	Leu	Cys	Lys	Gly	Asp	Asn	Leu	Tyr	Leu	Ser	Ala
				245					250					255	
Val	Asp	Val	Cys	Gly	Met	Phe	Thr	Asn	Arg	Leu	Gly	Ser	Gln	Gln	Trp
			260					265					270		
Arg	Gly	Leu	Ser	Arg	Tyr	Phe	Lys	Val	Gln	Leu	Arg	Lys	Arg	Arg	Val
		275					280					285			
Lys	Asn	Pro	Tyr	Pro	Ile	Ser	Phe	Leu	Leu	Thr	Asp	Leu	Ile	Asn	Arg
	290					295					300				
Arg	Thr	Pro	Arg	Val	Asp	Gly	Gln	Pro	Met	Tyr	Gly	Met	Asp	Ala	Gln
305					310					315					320
Val	Glu	Glu	Val	Arg	Val	Phe	Glu	Gly	Thr	Glu	Glu	Leu	Pro	Gly	Asp
				325					330					335	
Pro	Asp	Met	Met	Arg	Tyr	Val	Asp	Lys	Tyr	Gly	Gln	Leu	Gln	Thr	Lys
			340					345					350		
Met Leu															
<210> 10															
<211> 354															
<212> PRT															
<213> Virus JC															
<400> 10															
Met	Ala	Pro	Thr	Lys	Arg	Lys	Gly	Glu	Arg	Lys	Asp	Pro	Val	Gln	Val
1				5					10					15	
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Arg	Gly	Gly	Val	Glu	Val	Leu	Glu	Val	Lys	Thr
			20					25					30		
Gly	Val	Asp	Ser	Ile	Thr	Glu	Val	Glu	Cys	Phe	Leu	Thr	Pro	Glu	Met
		35				40						45			
Gly	Asp	Pro	Asp	Glu	His	Leu	Arg	Gly	Phe	Ser	Lys	Ser	Ile	Ser	Ile
	50					55					60				

5

ES 2 842 425 T3

Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Ser Lys Asp Met Leu Pro Cys
65 70 75 80

Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
85 90 95

Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
100 105 110

Ile Gly Val Thr Ser Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Ala
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Leu

<210> 11

<211> 354

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 11

ES 2 842 425 T3

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Arg Lys Asp Pro Val Gln Val
 1 5 10 15
 Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
 20 25 30
 Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
 35 40 45
 Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile
 50 55 60
 Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Lys Asp Met Leu Pro Cys
 65 70 75 80
 Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
 85 90 95
 Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
 100 105 110
 Leu Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Thr
 115 120 125
 His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln Gly Thr Ser Phe His Phe
 130 135 140
 Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu Gln Gly Val Val Phe Asn
 145 150 155 160
 Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile Phe Pro Lys Asn Ala Thr
 165 170 175
 Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His Lys Ala Tyr Leu Asp Lys
 180 185 190
 Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val Pro Asp Pro Thr Arg Asn
 195 200 205

ES 2 842 425 T3

Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr Gly Gly Glu Asn Val Pro
 210 215 220
 Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu
 225 230 235
 Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp Asn Leu Tyr Leu Ser Ala
 245 250 255
 Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg Ser Gly Phe Gln Gln Trp
 260 265 270
 Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln Leu Arg Lys Arg Arg Val
 275 280 285
 Lys Asn Pro Tyr Pro Ile Ser Phe Leu Leu Thr Asp Leu Ile Asn Arg
 290 295 300
 Arg Thr Pro Arg Val Asp Gly Gln Pro Met Tyr Gly Met Asp Ala Gln
 305 310 315
 Val Glu Glu Val Arg Val Phe Glu Gly Thr Glu Glu Leu Pro Gly Asp
 325 330 335
 Pro Asp Met Met Arg Tyr Val Asp Arg Tyr Gly Gln Leu Gln Thr Lys
 340 345 350

Met Leu

<210> 12

<211> 354

<212> PRT

5 <213> Virus JC

<400> 12

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Arg Lys Asp Pro Val Gln Val
 1 5 10 15
 Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
 20 25 30
 Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
 35 40 45
 Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile
 50 55 60
 Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Lys Asp Met Leu Pro Cys
 65 70 75 80

ES 2 842 425 T3

Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
 85 90 95
 Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
 100 105 110
 Leu Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Thr
 115 120 125
 His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln Gly Thr Ser Phe His Phe
 130 135 140
 Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu Gln Gly Val Val Phe Asn
 145 150 155 160
 Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile Phe Pro Lys Asn Ala Thr
 165 170 175
 Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His Lys Ala Tyr Leu Asp Lys
 180 185 190
 Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val Pro Asp Pro Thr Arg Asn
 195 200 205
 Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr Gly Gly Glu Asn Val Pro
 210 215 220
 Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu
 225 230 235 240
 Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp Asn Leu Tyr Leu Ser Ala
 245 250 255
 Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg Ser Gly Ser Gln Gln Trp
 260 265 270
 Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln Leu Arg Lys Arg Arg Val
 275 280 285
 Lys Asn Pro Tyr Pro Ile Ser Phe Leu Leu Thr Asp Leu Ile Asn Arg
 290 295 300
 Arg Thr Pro Arg Val Asp Gly Gln Pro Met Tyr Gly Met Asp Ala Gln
 305 310 315 320
 Val Glu Glu Val Arg Val Phe Glu Gly Thr Glu Glu Leu Pro Gly Asp
 325 330 335
 Pro Asp Met Met Arg Tyr Val Asp Arg Tyr Gly Gln Leu Gln Thr Lys
 340 345 350

Met Leu

<210> 13

<211> 354

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 13

ES 2 842 425 T3

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Arg Lys Asp Pro Val Gln Val
1 5 10 15

Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
20 25 30

Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
35 40 45

Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile
50 55 60

Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Lys Asp Met Leu Pro Cys
65 70 75 80

Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
85 90 95

Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
100 105 110

Leu Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Thr
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu

ES 2 842 425 T3

225 230 235 240

Phe Gly Val Gly Pro₂₄₅ Leu Cys Lys Gly Asp₂₅₀ Asn Leu Tyr Leu Ser₂₅₅ Ala

Val Asp Val Cys₂₆₀ Gly Met Phe Thr Asn₂₆₅ Arg Ser Gly Ser Gln₂₇₀ Gln Trp

Arg Gly Leu₂₇₅ Ser Arg Tyr Phe Lys₂₈₀ Val Gln Leu Arg Lys₂₈₅ Arg Arg Val

Lys Asn₂₉₀ Pro Tyr Pro Ile Ser₂₉₅ Phe Leu Leu Thr Asp₃₀₀ Leu Ile Asn Arg

Arg Thr Pro Arg Val Asp₃₁₀ Gly Gln Pro Met Tyr₃₁₅ Gly Met Asp Ala Gln₃₂₀

Val Glu Glu Val Arg₃₂₅ Val Phe Glu Gly Thr₃₃₀ Glu Glu Leu Pro Gly₃₃₅ Asp

Pro Asp Met Met₃₄₀ Arg Tyr Val Asp₃₄₅ Arg Tyr Gly Gln Leu Gln₃₅₀ Thr Lys

Met Leu

<210> 14

<211> 354

<212> PRT

5 <213> Virus JC

<400> 14

ES 2 842 425 T3

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

ES 2 842 425 T3

Leu Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Thr
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Leu

<210> 15

<211> 354

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 15

ES 2 842 425 T3

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Arg Lys Asp Pro Val Gln Val
 1 5 10 15
 Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
 20 25 30
 Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
 35 40 45
 Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile
 50 55 60
 Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Lys Asp Met Leu Pro Cys
 65 70 75 80
 Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
 85 90 95
 Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
 100 105 110
 Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Thr
 115 120 125
 His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln Gly Thr Ser Phe His Phe
 130 135 140
 Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu Gln Gly Val Val Phe Asn
 145 150 155 160
 Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile Phe Pro Lys Asn Ala Thr
 165 170 175
 Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His Lys Ala Tyr Leu Asp Lys
 180 185 190
 Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val Pro Asp Pro Thr Arg Asn
 195 200 205
 Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr Gly Gly Glu Asn Val Pro
 210 215 220
 Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu
 225 230 235 240
 Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp Asn Leu Tyr Leu Ser Ala
 245 250 255

ES 2 842 425 T3

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

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

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

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

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

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

Met Leu

<210> 16

<211> 354

<212> PRT

5

<213> Virus JC

<400> 16

ES 2 842 425 T3

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

ES 2 842 425 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Leu

<210> 17

<211> 354

<212> PRT

5

<213> Virus JC

<400> 17

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Arg Lys Asp Pro Val Gln Val

ES 2 842 425 T3

1	5	10	15
Pro Lys Leu	Leu ₂₀ Ile Arg Gly Gly Val ₂₅	Glu Val Leu Glu Val ₃₀	Lys Thr
Gly Val Asp ₃₅	Ser Ile Thr Glu Val ₄₀	Glu Cys Phe Leu Thr ₄₅	Pro Glu Met
Gly Asp ₅₀	Pro Asp Glu His Leu ₅₅	Arg Gly Phe Ser Lys ₆₀	Ser Ile Ser Ile
Ser Asp ₆₅	Thr Phe Glu Ser ₇₀	Asp Ser Pro Asn Lys ₇₅	Asp Met Leu Pro Cys ₈₀
Tyr Ser Val Ala	Arg ₈₅ Ile Pro Leu Pro Asn ₉₀	Leu Asn Glu Asp Leu ₉₅	Thr
Cys Gly Asn	Ile ₁₀₀ Leu Met Trp Glu Ala ₁₀₅	Val Thr Leu Lys Thr ₁₁₀	Glu Val
Ile Gly Val ₁₁₅	Thr Thr Leu Met Asn ₁₂₀	Val His Ser Asn Gly ₁₂₅	Gln Ala Thr
His Asp ₁₃₀	Asn Gly Ala Gly Lys ₁₃₅	Pro Val Gln Gly Thr ₁₄₀	Ser Phe His Phe
Phe Ser Val Gly Gly Glu ₁₅₀	Ala Leu Glu Leu Gln ₁₅₅	Gly Val Val Phe Asn ₁₆₀	
Tyr Arg Thr Lys	Tyr ₁₆₅ Pro Asp Gly Thr Ile ₁₇₀	Phe Pro Lys Asn Ala ₁₇₅	Thr
Val Gln Ser Gln ₁₈₀	Val Met Asn Thr Glu ₁₈₅	His Lys Ala Tyr Leu ₁₉₀	Asp Lys
Asn Lys Ala ₁₉₅	Tyr Pro Val Glu Cys ₂₀₀	Trp Val Pro Asp Pro ₂₀₅	Thr Arg Asn
Glu Asn Thr Arg Tyr Phe	Gly ₂₁₅ Thr Leu Thr Gly ₂₂₀	Gly Glu Asn Val Pro	
Pro Val Leu His Ile Thr ₂₃₀	Asn Thr Ala Thr Thr ₂₃₅	Val Leu Leu Asp Glu ₂₄₀	
Phe Gly Val Gly Pro ₂₄₅	Leu Cys Lys Gly Asp ₂₅₀	Asn Leu Tyr Leu Ser ₂₅₅	Ala
Val Asp Val Cys ₂₆₀	Gly Met Phe Thr Asn ₂₆₅	Arg Ser Gly Tyr Gln ₂₇₀	Gln Trp
Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln Leu Arg Lys Arg Arg Val			

ES 2 842 425 T3

275

280

285

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

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

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

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

Met Leu

<210> 18

<211> 354

<212> PRT

5 <213> Virus JC

<400> 18

ES 2 842 425 T3

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Arg Lys Asp Pro Val Gln Val
 1 5 10 15
 Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
 20 25 30
 Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
 35 40 45
 Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile
 50 55 60
 Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Ser Lys Asp Met Leu Pro Cys
 65 70 75 80
 Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
 85 90 95
 Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
 100 105 110
 Ile Gly Val Thr Ser Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Ala
 115 120 125
 His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln Gly Thr Ser Phe His Phe
 130 135 140
 Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu Gln Gly Val Val Phe Asn
 145 150 155 160

ES 2 842 425 T3

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

 Met Leu
 <210> 19
 <211> 354
 <212> PRT
 <213> Virus JC
 <400> 19
 Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Arg Lys Asp Pro Val Gln Val
 1 5 10 15
 Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
 20 25 30

5

ES 2 842 425 T3

Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
 35 40 45
 Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile
 50 55 60
 Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Ser Lys Asp Met Leu Pro Cys
 65 70 75 80
 Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
 85 90 95
 Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
 100 105 110
 Ile Gly Val Thr Ser Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Ala
 115 120 125
 His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln Gly Thr Ser Phe His Phe
 130 135 140
 Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu Gln Gly Val Val Phe Asn
 145 150 155 160
 Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile Phe Pro Lys Asn Ala Thr
 165 170 175
 Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His Lys Ala Tyr Leu Asp Lys
 180 185 190
 Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val Pro Asp Pro Thr Arg Asn
 195 200 205
 Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr Gly Gly Glu Asn Val Pro
 210 215 220
 Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu
 225 230 235 240
 Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp Asn Leu Tyr Leu Ser Ala
 245 250 255
 Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg Ser Gly Phe Gln Gln Trp
 260 265 270
 Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln Leu Arg Lys Arg Arg Val
 275 280 285
 Lys Asn Pro Tyr Pro Ile Ser Phe Leu Leu Thr Asp Leu Ile Asn Arg
 290 295 300

ES 2 842 425 T3

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

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

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

Met Leu

<210> 20

<211> 354

<212> PRT

5 <213> Virus JC

<400> 20

ES 2 842 425 T3

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Arg Lys Asp Pro Val Gln Val
 1 5 10 15

Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
 20 25 30

Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
 35 40 45

Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile
 50 55 60

Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Ser Lys Asp Met Leu Pro Cys
 65 70 75 80

Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
 85 90 95

Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
 100 105 110

Ile Gly Val Thr Ser Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Ala
 115 120 125

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

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

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

ES 2 842 425 T3

Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His Lys Ala Tyr Leu Asp Lys
 180 185 190
 Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val Pro Asp Pro Thr Arg Asn
 195 200 205
 Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr Gly Gly Glu Asn Val Pro
 210 215 220
 Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu
 225 230 235 240
 Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp Asn Leu Tyr Leu Ser Ala
 245 250 255
 Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg Ser Gly Phe Gln Gln Trp
 260 265 270
 Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln Leu Arg Lys Arg Arg Val
 275 280 285
 Lys Asn Pro Tyr Pro Ile Ser Phe Leu Leu Thr Asp Leu Ile Asn Arg
 290 295 300
 Arg Thr Pro Arg Val Asp Gly Gln Pro Met Tyr Gly Met Asp Ala Gln
 305 310 315 320
 Val Glu Glu Val Arg Val Phe Glu Gly Thr Glu Glu Leu Pro Gly Asp
 325 330 335
 Pro Asp Met Met Arg Tyr Val Asp Lys Tyr Gly Gln Leu Gln Thr Lys
 340 345 350

 Met Leu
 <210> 21
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> Virus JC
 <400> 21
 Met Gly Ala Ala Leu Ala Leu Leu Gly Asp Leu Val Ala Thr Val Ser
 1 5 10 15
 Glu Ala Ala Ala Ala Thr Gly Phe Ser Val Ala Glu Ile Ala Ala Gly
 20 25 30
 Glu Ala Ala Ala Thr Ile Glu Val Glu Ile Ala Ser Leu Ala Thr Val
 35 40 45
 Glu Gly Ile Thr Ser Thr Ser Glu Ala Ile Ala Ala Ile Gly Leu Thr

5

ES 2 842 425 T3

50 55 60
 Pro Glu Thr Tyr Ala Val Ile Thr Gly Ala Pro Gly Ala Val Ala Gly
 65 70 75 80
 Phe Ala Ala Leu Val Gln Thr Val Thr Gly Gly Ser Ala Ile Ala Gln
 85 90 95
 Leu Gly Tyr Arg Phe Phe Ala Asp Trp Asp His Lys Val Ser Thr Val
 100 105 110
 Gly Leu Phe Gln Gln Pro Ala Met Ala Leu Gln Leu Phe Asn Pro Glu
 115 120 125
 Asp Tyr Tyr Asp Ile Leu Phe Pro Gly Val Asn Ala Phe Val Asn Asn
 130 135 140
 Ile His Tyr Leu Asp Pro Arg His Trp Gly Pro Ser Leu Phe Ser Thr
 145 150 155 160
 Ile Ser Gln Ala Phe Trp Asn Leu Val Arg Asp Asp Leu Pro Ser Leu
 165 170
 Thr Ser Gln Glu Ile Gln Arg Arg Thr Gln Lys Leu Phe Val Glu Ser
 180 185 190
 Leu Ala Arg Phe Leu Glu Glu Thr Thr Trp Ala Ile Val Asn Ser Pro
 195 200 205
 Val Asn Leu Tyr Asn Tyr Ile Ser Asp Tyr Tyr Ser Arg Leu Ser Pro
 210 215 220
 Val Arg Pro Ser Met Val Arg Gln Val Ala Gln Arg Glu Gly Thr Tyr
 225 230 235
 Ile Ser Phe Gly His Ser Tyr Thr Gln Ser Ile Asp Asp Ala Asp Ser
 245 250 255
 Ile Gln Glu Val Thr Gln Arg Leu Asp Leu Lys Thr Pro Asn Val Gln
 260 265 270
 Ser Gly Glu Phe Ile Glu Lys Ser Ile Ala Pro Gly Gly Ala Asn Gln
 275 280 285
 Arg Ser Ala Pro Gln Trp Met Leu Pro Leu Leu Leu Gly Leu Tyr Gly
 290 295 300
 Thr Val Thr Pro Ala Leu Glu Ala Tyr Glu Asp Gly Pro Asn Lys Lys
 305 310 315 320
 Lys Arg Arg Lys Glu Gly Pro Arg Ala Ser Ser Lys Thr Ser Tyr Lys
 325 330 335
 Arg Arg Ser Arg Ser Ser Arg Ser
 340

<210> 22

<211> 354

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 22

ES 2 842 425 T3

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Arg Lys Asp Pro Val Gln Val
 1 5 10 15
 Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
 20 25 30
 Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
 35 40 45
 Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile
 50 55 60
 Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Lys Asp Met Leu Pro Cys
 65 70 75 80
 Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
 85 90 95
 Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
 100 105 110
 Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Thr
 115 120 125
 His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln Gly Thr Ser Phe His Phe
 130 135 140
 Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu Gln Gly Val Val Phe Asn
 145 150 155 160
 Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile Phe Pro Lys Asn Ala Thr
 165 170 175
 Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His Lys Ala Tyr Leu Asp Lys
 180 185 190
 Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val Pro Asp Pro Thr Arg Asn
 195 200 205
 Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr Gly Gly Glu Asn Val Pro
 210 215 220

ES 2 842 425 T3

Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu
 225 230 235 240
 Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp Asn Leu Tyr Leu Ser Ala
 245 250 255
 Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg Ser Gly Ser Gln Gln Trp
 260 265 270
 Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln Leu Arg Lys Arg Arg Val
 275 280 285
 Lys Asn Pro Tyr Pro Ile Ser Phe Leu Leu Thr Asp Leu Ile Asn Arg
 290 295 300
 Arg Thr Pro Arg Val Asp Gly Gln Pro Met Tyr Gly Met Asp Ala Gln
 305 310 315 320
 Val Glu Glu Val Arg Val Phe Glu Gly Thr Glu Glu Leu Pro Gly Asp
 325 330 335
 Pro Asp Met Met Arg Tyr Val Asp Arg Tyr Gly Gln Leu Gln Thr Lys
 340 345 350

Met Leu

<210> 23

<211> 354

<212> PRT

5 <213> Virus JC

<400> 23

ES 2 842 425 T3

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

ES 2 842 425 T3

Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
 100 105 110
 Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Thr
 115 120 125
 His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln Gly Thr Ser Phe His Phe
 130 135 140
 Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu Gln Gly Val Val Phe Asn
 145 150 155 160
 Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile Phe Pro Lys Asn Ala Thr
 165 170 175
 Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His Lys Ala Tyr Leu Asp Lys
 180 185 190
 Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val Pro Asp Pro Thr Arg Asn
 195 200 205
 Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr Gly Gly Glu Asn Val Pro
 210 215 220
 Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu
 225 230 235 240
 Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp Asn Leu Tyr Leu Ser Ala
 245 250 255
 Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg Ser Gly Ser Gln Gln Trp
 260 265 270
 Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln Leu Arg Lys Arg Arg Val
 275 280 285
 Lys Asn Pro Tyr Pro Ile Ser Phe Leu Leu Thr Asp Leu Ile Asn Arg
 290 295 300
 Arg Thr Pro Arg Val Asp Gly Gln Pro Met Tyr Gly Met Asp Ala Gln
 305 310 315 320
 Val Glu Glu Val Arg Val Phe Glu Gly Thr Glu Glu Leu Pro Gly Asp
 325 330 335
 Pro Asp Met Met Arg Tyr Val Asp Arg Tyr Gly Gln Leu Gln Thr Lys
 340 345 350

Met Leu

<210> 24

<211> 354

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 24

ES 2 842 425 T3

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Arg Lys Asp Pro Val Gln Val
 1 5 10 15
 Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
 20 25 30
 Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
 35 40 45
 Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile
 50 55 60
 Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Lys Asp Met Leu Pro Cys
 65 70 75 80
 Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
 85 90 95
 Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
 100 105 110
 Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Thr
 115 120 125
 His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln Gly Thr Ser Phe His Phe
 130 135 140
 Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu Gln Gly Val Val Phe Asn
 145 150 155 160
 Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile Phe Pro Lys Asn Ala Thr
 165 170 175
 Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His Lys Ala Tyr Leu Asp Lys
 180 185 190
 Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val Pro Asp Pro Thr Arg Asn
 195 200 205
 Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr Gly Gly Glu Asn Val Pro
 210 215 220
 Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu
 225 230 235 240

ES 2 842 425 T3

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

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

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

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

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

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

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

Met Leu

<210> 25

<211> 354

<212> PRT

5 <213> Virus JC

<400> 25

ES 2 842 425 T3

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

ES 2 842 425 T3

115					120					125					
His	Asp	Asn	Gly	Ala	Gly	Lys	Pro	Val	Gln	Gly	Thr	Ser	Phe	His	Phe
	130					135					140				
Phe	Ser	Val	Gly	Gly	Glu	Ala	Leu	Glu	Leu	Gln	Gly	Val	Val	Phe	Asn
145					150					155					160
Tyr	Arg	Thr	Lys	Tyr	Pro	Asp	Gly	Thr	Ile	Phe	Pro	Lys	Asn	Ala	Thr
				165					170					175	
Val	Gln	Ser	Gln	Val	Met	Asn	Thr	Glu	His	Lys	Ala	Tyr	Leu	Asp	Lys
			180					185					190		
Asn	Lys	Ala	Tyr	Pro	Val	Glu	Cys	Trp	Val	Pro	Asp	Pro	Thr	Arg	Asn
		195					200					205			
Glu	Asn	Thr	Arg	Tyr	Phe	Gly	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly	Glu	Asn	Val	Pro
	210					215					220				
Pro	Val	Leu	His	Ile	Thr	Asn	Thr	Ala	Thr	Thr	Val	Leu	Leu	Asp	Glu
225					230					235					240
Phe	Gly	Val	Gly	Pro	Leu	Cys	Lys	Gly	Asp	Asn	Leu	Tyr	Leu	Ser	Ala
				245					250					255	
Val	Asp	Val	Cys	Gly	Met	Phe	Thr	Asn	Arg	Ser	Gly	Ser	Gln	Gln	Trp
			260					265					270		
Arg	Gly	Leu	Ser	Arg	Tyr	Phe	Lys	Val	Gln	Leu	Arg	Lys	Arg	Arg	Val
		275					280					285			
Lys	Asn	Pro	Tyr	Pro	Ile	Ser	Phe	Leu	Leu	Thr	Asp	Leu	Ile	Asn	Arg
	290					295					300				
Arg	Thr	Pro	Arg	Val	Asp	Gly	Gln	Pro	Met	Tyr	Gly	Met	Asp	Ala	Gln
305					310					315					320
Val	Glu	Glu	Val	Arg	Val	Phe	Glu	Gly	Thr	Glu	Glu	Leu	Pro	Gly	Asp
				325					330					335	
Pro	Asp	Met	Met	Arg	Tyr	Val	Asp	Arg	Tyr	Gly	Gln	Leu	Gln	Thr	Lys
			340					345					350		

Met Leu
 <210> 26
 <211> 354
 <212> PRT
 <213> Virus JC
 <400> 26

ES 2 842 425 T3

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Arg Lys Asp Pro Val Gln Val
1 5 10 15

Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
20 25 30

Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
35 40 45

Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile
50 55 60

Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Lys Asp Met Leu Pro Cys
65 70 75 80

Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
85 90 95

Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
100 105 110

Leu Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Thr
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 842 425 T3

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

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

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

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

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

Met Leu

<210> 27

<211> 354

<212> PRT

5 <213> Virus JC

<400> 27

ES 2 842 425 T3

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Arg Lys Asp Pro Val Gln Val
 1 5 10 15

Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
 20 25 30

Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
 35 40 45

Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe Ser Met Ser Ile Ser Ile
 50 55 60

Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Lys Asp Met Leu Pro Cys
 65 70 75 80

Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
 85 90 95

Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
 100 105 110

Leu Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Thr
 115 120 125

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

ES 2 842 425 T3

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

Met Leu

<210> 28

<211> 354

<212> PRT

5

<213> Virus JC

<400> 28

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Arg Lys Asp Pro Val Gln Val
 1 5 10 15

ES 2 842 425 T3

Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
 20 25 30
 Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
 35 40 45
 Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile
 50 55 60
 Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Lys Asp Met Leu Pro Cys
 65 70 75 80
 Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
 85 90 95
 Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
 100 105 110
 Leu Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His Cys Asn Gly Gln Ala Thr
 115 120 125
 His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln Gly Thr Ser Phe His Phe
 130 135 140
 Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu Gln Gly Val Val Phe Asn
 145 150 155 160
 Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile Phe Pro Lys Asn Ala Thr
 165 170 175
 Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His Lys Ala Tyr Leu Asp Lys
 180 185 190
 Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val Pro Asp Pro Thr Arg Asn
 195 200 205
 Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr Gly Gly Glu Asn Val Pro
 210 215 220
 Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu
 225 230 235 240
 Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp Asn Leu Tyr Leu Ser Ala
 245 250 255
 Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg Ser Gly Ser Gln Gln Trp
 260 265 270
 Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln Leu Arg Lys Arg Arg Val
 275 280 285

ES 2 842 425 T3

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

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

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

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

Met Leu

<210> 29

<211> 354

<212> PRT

5 <213> Virus JC

<400> 29

ES 2 842 425 T3

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Arg Lys Asp Pro Val Gln Val
 1 5 10 15
 Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
 20 25 30
 Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
 35 40 45
 Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile
 50 55 60
 Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Lys Asp Met Leu Pro Cys
 65 70 75 80
 Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
 85 90 95
 Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
 100 105 110
 Leu Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His Cys Asn Gly Gln Ala Thr
 115 120 125
 His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln Gly Thr Ser Phe His Phe
 130 135 140
 Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu Gln Gly Val Val Phe Asn
 145 150 155 160
 Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile Phe Pro Lys Asn Ala Thr

ES 2 842 425 T3

```

          165                      170                      175
Val Gl'n Ser Gl'n Val Met Asn Thr Glu His Lys Ala Tyr Leu Asp Lys
      180      185
Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val Pro Asp Pro Thr Arg Asn
      195      200      205
Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr Gly Gly Glu Asn Val Pro
      210      215      220
Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu
      225      230      235
Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp Asn Leu Tyr Leu Ser Ala
      245      250      255
Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg Ser Gly Ser Gl'n Gl'n Trp
      260      265
Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gl'n Leu Arg Lys Arg Arg Val
      275      280      285
Lys Asn Pro Tyr Pro Ile Ser Phe Leu Leu Thr Asp Leu Ile Asn Arg
      290      295      300
Arg Thr Pro Arg Val Asp Gly Gl'n Pro Met Tyr Gly Met Asp Ala Gl'n
      305      310      315      320
Val Glu Glu Val Arg Val Phe Glu Gly Thr Glu Glu Leu Pro Gly Asp
      325      330      335
Pro Asp Met Met Arg Tyr Val Asp Arg Tyr Gly Gl'n Leu Gl'n Thr Lys
      340      345      350

```

Met Leu

<210> 30

<211> 245

<212> PRT

5 <213> Virus JC

<400> 30

ES 2 842 425 T3

Phe Leu Thr Pro Glu Met Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe
 1 5 10 15
 Ser Lys Ser Ile Ser Ile Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn
 20 25 30
 Lys Asp Met Leu Pro Cys Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn
 35 40 45
 Leu Asn Glu Asp Leu Thr Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val
 50 55 60
 Thr Leu Lys Thr Glu Val Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His
 65 70 75 80
 Ser Asn Gly Gln Ala Thr His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln
 85 90 95
 Gly Thr Ser Phe His Phe Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu
 100 105 110
 Gln Gly Val Val Phe Asn Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile
 115 120 125
 Phe Pro Lys Asn Ala Thr Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His
 130 135 140
 Lys Ala Tyr Leu Asp Lys Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val
 145 150 155 160
 Pro Asp Pro Thr Arg Asn Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr
 165 170 175
 Gly Gly Glu Asn Val Pro Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr
 180 185 190
 Thr Val Leu Leu Asp Glu Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp
 195 200 205
 Asn Leu Tyr Leu Ser Ala Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gln Gln Trp Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln
 225 230 235 240
 Leu Arg Lys Arg Arg
 245

<210> 31

<211> 245

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 31

ES 2 842 425 T3

Phe Leu Thr Pro Glu Met Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe
 1 5 10 15
 Ser Lys Ser Ile Ser Ile Ser His Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn
 20 25 30
 Lys Asp Met Leu Pro Cys Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn
 35 40 45
 Leu Asn Glu Asp Leu Thr Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val
 50 55 60
 Thr Leu Lys Thr Glu Val Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His
 65 70 75 80
 Ser Asn Gly Gln Ala Thr His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln
 85 90 95
 Gly Thr Ser Phe His Phe Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu
 100 105 110
 Gln Gly Val Val Phe Asn Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile
 115 120 125
 Phe Pro Lys Asn Ala Thr Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His
 130 135 140
 Lys Ala Tyr Leu Asp Lys Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val
 145 150 155 160
 Pro Asp Pro Thr Arg Asn Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr
 165 170 175
 Gly Gly Glu Asn Val Pro Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr
 180 185 190
 Thr Val Leu Leu Asp Glu Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp
 195 200 205
 Asn Leu Tyr Leu Ser Ala Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gln Gln Trp Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln
 225 230 235 240
 Leu Arg Lys Arg Arg
 245

<210> 32

5

<211> 245

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 32

ES 2 842 425 T3

Phe Leu Thr Pro Glu Met Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe
 1 5 10 15
 Ser Lys Ser Ile Ser Ile Ser Asn Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn
 20 25 30
 Lys Asp Met Leu Pro Cys Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn
 35 40 45
 Leu Asn Glu Asp Leu Thr Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val
 50 55 60
 Thr Leu Lys Thr Glu Val Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His
 65 70 75 80
 Ser Asn Gly Gln Ala Thr His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln
 85 90 95
 Gly Thr Ser Phe His Phe Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu
 100 105 110
 Gln Gly Val Val Phe Asn Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile
 115 120 125
 Phe Pro Lys Asn Ala Thr Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His
 130 135 140
 Lys Ala Tyr Leu Asp Lys Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val
 145 150 155 160
 Pro Asp Pro Thr Arg Asn Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr
 165 170 175
 Gly Gly Glu Asn Val Pro Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr
 180 185 190
 Thr Val Leu Leu Asp Glu Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp
 195 200 205
 Asn Leu Tyr Leu Ser Ala Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gln Gln Trp Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln
 225 230 235 240
 Leu Arg Lys Arg Arg
 245

<210> 33

<211> 245

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 33

5

ES 2 842 425 T3

Phe Leu Thr Pro Glu Met Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe
 1 5 10 15
 Ser Glu Ser Ile Ser Ile Ser His Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn
 20 25 30
 Lys Asp Met Leu Pro Cys Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn
 35 40 45
 Leu Asn Glu Asp Leu Thr Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val
 50 55 60
 Thr Leu Lys Thr Glu Val Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His
 65 70 75 80
 Ser Asn Gly Gln Ala Thr His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln
 85 90 95
 Gly Thr Ser Phe His Phe Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu
 100 105 110
 Gln Gly Val Val Phe Asn Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile
 115 120 125
 Phe Pro Lys Asn Ala Thr Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His
 130 135 140
 Lys Ala Tyr Leu Asp Lys Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val
 145 150 155 160
 Pro Asp Pro Thr Arg Asn Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr
 165 170 175
 Gly Gly Glu Asn Val Pro Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr
 180 185 190
 Thr Val Leu Leu Asp Glu Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp
 195 200 205
 Asn Leu Tyr Leu Ser Ala Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gln Gln Trp Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln
 225 230 235 240
 Leu Arg Lys Arg Arg
 245

<210> 34

5

<211> 245

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 34

ES 2 842 425 T3

Phe Leu Thr Pro Glu Met Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe
 1 5 10 15
 Ser Lys Ser Ile Ser Ile Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn
 20 25 30
 Lys Asp Met Leu Pro Cys Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn
 35 40 45
 Leu Asn Glu Asp Leu Thr Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val
 50 55 60
 Thr Leu Lys Thr Glu Val Leu Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His
 65 70 75 80
 Ser Asn Gly Gln Ala Thr His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln
 85 90 95
 Gly Thr Ser Phe His Phe Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu
 100 105 110
 Gln Gly Val Val Phe Asn Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile
 115 120 125
 Phe Pro Lys Asn Ala Thr Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His
 130 135 140
 Lys Ala Tyr Leu Asp Lys Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val
 145 150 155 160
 Pro Asp Pro Thr Arg Asn Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr
 165 170 175
 Gly Gly Glu Asn Val Pro Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr
 180 185 190
 Thr Val Leu Leu Asp Glu Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp
 195 200 205
 Asn Leu Tyr Leu Ser Ala Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg
 210 215 220
 Phe Gly Ser Gln Gln Trp Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln
 225 230 235 240
 Leu Arg Lys Arg Arg
 245

<210> 35

<211> 245

<212> PRT

5 <213> Virus JC

<400> 35

ES 2 842 425 T3

Phe Leu Thr Pro Glu Met Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe
 1 5 10 15
 Ser Met Ser Ile Ser Ile Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn
 20 25 30
 Lys Asp Met Leu Pro Cys Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn
 35 40 45
 Leu Asn Glu Asp Leu Thr Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val
 50 55 60
 Thr Leu Lys Thr Glu Val Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His
 65 70 75 80
 Ser Asn Gly Gln Ala Thr His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln
 85 90 95
 Gly Thr Ser Phe His Phe Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu
 100 105 110
 Gln Gly Val Val Phe Asn Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile
 115 120 125
 Phe Pro Lys Asn Ala Thr Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His
 130 135 140
 Lys Ala Tyr Leu Asp Lys Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val
 145 150 155 160
 Pro Asp Pro Thr Arg Asn Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr
 165 170 175
 Gly Gly Glu Asn Val Pro Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr
 180 185 190
 Thr Val Leu Leu Asp Glu Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp
 195 200 205
 Asn Leu Tyr Leu Ser Ala Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gln His Trp Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln
 225 230 235 240
 Leu Arg Lys Arg Arg
 245

<210> 36

<211> 245

<212> PRT

5 <213> Virus JC

<400> 36

ES 2 842 425 T3

Phe Leu Thr Pro Glu Met Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe
 1 5 10 15
 Ser Lys Ser Ile Ser Ile Ser His Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn
 20 25 30
 Lys Asp Met Leu Pro Cys Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn
 35 40 45
 Leu Asn Glu Asp Leu Thr Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val
 50 55 60
 Thr Leu Lys Thr Glu Val Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His
 65 70 75 80
 Ser Asn Gly Gln Ala Thr His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln
 85 90 95
 Gly Thr Ser Phe His Phe Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu
 100 105 110
 Gln Gly Val Val Phe Asn Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile
 115 120 125
 Phe Pro Lys Asn Ala Thr Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His
 130 135 140
 Lys Ala Tyr Leu Asp Lys Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val
 145 150 155 160
 Pro Asp Pro Thr Arg Asn Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr
 165 170 175
 Gly Gly Glu Asn Val Pro Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr
 180 185 190
 Thr Val Leu Leu Asp Glu Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp
 195 200 205
 Asn Leu Tyr Leu Ser Ala Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gln Gln Trp Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln
 225 230 235 240
 Leu Arg Lys Arg Arg
 245

<210> 37

5

<211> 245

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 37

ES 2 842 425 T3

Phe Leu Thr Pro Glu Met Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe
 1 5 10 15
 Ser Lys Ser Ile Ser Ile Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn
 20 25 30
 Lys Asp Met Leu Pro Cys Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn
 35 40 45
 Leu Asn Glu Asp Leu Thr Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val
 50 55 60
 Thr Leu Lys Thr Glu Val Leu Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His
 65 70 75 80
 Ser Asn Gly Gln Ala Thr His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln
 85 90 95
 Gly Thr Ser Phe His Phe Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu
 100 105 110
 Gln Gly Val Val Phe Asn Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile
 115 120 125
 Phe Pro Lys Asn Ala Thr Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His
 130 135 140
 Lys Ala Tyr Leu Asp Lys Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val
 145 150 155 160
 Pro Asp Pro Thr Arg Asn Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr
 165 170 175
 Gly Gly Glu Asn Val Pro Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr
 180 185 190
 Thr Val Leu Leu Asp Glu Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp
 195 200 205
 Asn Leu Tyr Leu Ser Ala Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg
 210 215 220
 Ser Gly Phe Gln Gln Trp Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln
 225 230 235 240
 Leu Arg Lys Arg Arg
 245

<210> 38

5

<211> 245

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 38

ES 2 842 425 T3

Phe Leu Thr Pro Glu Met Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe
 1 5 10 15
 Ser Lys Ser Ile Ser Ile Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn
 20 25 30
 Lys Asp Met Leu Pro Cys Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn
 35 40 45
 Leu Asn Glu Asp Leu Thr Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val
 50 55 60
 Thr Leu Lys Thr Glu Val Leu Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His
 65 70 75 80
 Ser Asn Gly Gln Ala Thr His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln
 85 90 95
 Gly Thr Ser Phe His Phe Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu
 100 105 110
 Gln Gly Val Val Phe Asn Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile
 115 120 125
 Phe Pro Lys Asn Ala Thr Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His
 130 135 140
 Lys Ala Tyr Leu Asp Lys Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val
 145 150 155 160
 Pro Asp Pro Thr Arg Asn Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr
 165 170 175
 Gly Gly Glu Asn Val Pro Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr
 180 185 190
 Thr Val Leu Leu Asp Glu Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp
 195 200 205
 Asn Leu Tyr Leu Ser Ala Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg
 210 215 220
 Phe Gly Ser Gln Gln Trp Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln
 225 230 235 240
 Leu Arg Lys Arg Arg
 245

<210> 39

<211> 245

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 39

5

ES 2 842 425 T3

Phe Leu Thr Pro Glu Met Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe
 1 5 10 15
 Ser Lys Ser Ile Ser Ile Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn
 20 25 30
 Lys Asp Met Leu Pro Cys Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn
 35 40 45
 Leu Asn Glu Asp Leu Thr Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val
 50 55 60
 Thr Leu Lys Thr Glu Val Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His
 65 70 75 80
 Ser Asn Gly Gln Ala Thr His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln
 85 90 95
 Gly Thr Ser Phe His Phe Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu
 100 105 110
 Gln Gly Val Val Phe Asn Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile
 115 120 125
 Phe Pro Lys Asn Ala Thr Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His
 130 135 140
 Lys Ala Tyr Leu Asp Lys Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val
 145 150 155 160
 Pro Asp Pro Thr Arg Asn Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr
 165 170 175
 Gly Gly Glu Asn Ala Pro Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr
 180 185 190
 Thr Val Leu Leu Asp Glu Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp
 195 200 205
 Asn Leu Tyr Leu Ser Ala Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gln Gln Trp Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln
 225 230 235 240
 Leu Arg Lys Arg Arg
 245

<210> 40

<211> 245

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 40

5

ES 2 842 425 T3

Phe Leu Thr Pro Glu Met Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe
 1 5 10 15
 Ser Lys Ser Ile Ser Ile Ser Asp Thr Phe Asp Ser Asp Ser Pro Asn
 20 25 30
 Lys Asp Met Leu Pro Cys Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn
 35 40 45
 Leu Asn Glu Asp Leu Thr Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val
 50 55 60
 Thr Leu Lys Thr Glu Val Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His
 65 70 75 80
 Ser Asn Gly Gln Ala Thr His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln
 85 90 95
 Gly Thr Ser Phe His Phe Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu
 100 105 110
 Gln Gly Val Val Phe Asn Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile
 115 120 125
 Phe Pro Lys Asn Ala Thr Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His
 130 135 140
 Lys Ala Tyr Leu Asp Lys Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val
 145 150 155 160
 Pro Asp Pro Thr Arg Asn Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr
 165 170 175
 Gly Gly Glu Asn Val Pro Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr
 180 185 190
 Thr Val Leu Leu Asp Glu Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp
 195 200 205
 Asn Leu Tyr Leu Ser Ala Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg
 210 215 220
 Ser Gly Phe Gln Gln Trp Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln
 225 230 235 240
 Leu Arg Lys Arg Arg
 245

<210> 41

<211> 354

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 41

5

ES 2 842 425 T3

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Arg Lys Asp Pro Val Gln Val
 1 5 10 15
 Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
 20 25 30
 Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
 35 40 45
 Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile
 50 55 60
 Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Lys Asp Met Leu Pro Cys
 65 70 75 80
 Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
 85 90 95
 Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
 100 105 110
 Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Ala
 115 120 125
 His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln Gly Thr Ser Phe His Phe
 130 135 140
 Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu Gln Gly Val Val Phe Asn
 145 150 155 160
 Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile Phe Pro Lys Asn Ala Thr
 165 170 175
 Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His Lys Ala Tyr Leu Asp Lys

ES 2 842 425 T3

180					185					190					
Asn	Lys	Ala	Tyr	Pro	Val	Glu	Cys	Trp	Val	Pro	Asp	Pro	Thr	Arg	Asn
		195					200					205			
Glu	Asn	Thr	Arg	Tyr	Phe	Gly	Thr	Leu	Thr	Gly	Gly	Glu	Asn	Val	Pro
	210					215					220				
Pro	Val	Leu	His	Ile	Thr	Asn	Thr	Ala	Thr	Thr	Val	Leu	Leu	Asp	Glu
225					230					235					240
Phe	Gly	Val	Gly	Pro	Leu	Cys	Lys	Gly	Asp	Asn	Leu	Tyr	Leu	Ser	Ala
				245					250					255	
Val	Asp	Val	Cys	Gly	Met	Phe	Thr	Asn	Arg	Ser	Gly	Ser	Gln	Gln	Trp
			260					265					270		
Arg	Gly	Leu	Ser	Arg	Tyr	Phe	Lys	Val	Gln	Leu	Arg	Lys	Arg	Arg	Val
		275					280					285			
Lys	Asn	Pro	Tyr	Pro	Ile	Ser	Phe	Leu	Leu	Thr	Asp	Leu	Ile	Asn	Arg
	290					295					300				
Arg	Thr	Pro	Arg	Val	Asp	Gly	Gln	Pro	Met	Tyr	Gly	Met	Asp	Ala	Gln
305					310					315					320
Val	Glu	Glu	Val	Arg	Val	Phe	Glu	Gly	Thr	Glu	Glu	Leu	Pro	Gly	Asp
				325					330					335	
Pro	Asp	Met	Met	Arg	Tyr	Val	Asp	Arg	Tyr	Gly	Gln	Leu	Gln	Thr	Lys
			340					345					350		
Met Leu															
<210> 42															
<211> 354															
<212> PRT															
<213> Virus JC															
<400> 42															
Met	Ala	Pro	Thr	Lys	Arg	Lys	Gly	Glu	Arg	Lys	Asp	Pro	Val	Gln	Val
1				5					10					15	
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Arg	Gly	Gly	Val	Glu	Val	Leu	Glu	Val	Lys	Thr
			20					25					30		
Gly	Val	Asp	Ser	Ile	Thr	Glu	Val	Glu	Cys	Phe	Leu	Thr	Pro	Glu	Met
		35					40					45			
Gly	Asp	Pro	Asp	Glu	His	Leu	Arg	Gly	Phe	Ser	Lys	Ser	Ile	Ser	Ile
	50					55					60				

5

ES 2 842 425 T3

Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Lys Asp Met Leu Pro Cys
65 70 75 80

Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
85 90 95

Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
100 105 110

Leu Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Thr
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Leu

<210> 43

<211> 354

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 43

ES 2 842 425 T3

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Arg Lys Asp Pro Val Gln Val
1 5 10 15

Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
20 25 30

Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
35 40 45

Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile
50 55 60

Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Lys Asp Met Leu Pro Cys
65 70 75 80

Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
85 90 95

Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
100 105 110

Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Thr
115 120 125

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

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

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

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

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

ES 2 842 425 T3

Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr Gly Gly Glu Asn Val Pro
 210 215 220
 Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu
 225 230 235 240
 Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp Asn Leu Tyr Leu Ser Ala
 245 250 255
 Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg Phe Gly Ser Gln Gln Trp
 260 265 270
 Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln Leu Arg Lys Arg Arg Val
 275 280 285
 Lys Asn Pro Tyr Pro Ile Ser Phe Leu Leu Thr Asp Leu Ile Asn Arg
 290 295 300
 Arg Thr Pro Arg Val Asp Gly Gln Pro Met Tyr Gly Met Asp Ala Gln
 305 310 315 320
 Ile Glu Glu Val Arg Val Phe Glu Gly Thr Glu Gln Leu Pro Gly Asp
 325 330 335
 Pro Asp Met Met Arg Tyr Val Asp Arg Tyr Gly Gln Leu Gln Thr Lys
 340 345 350

Met Leu

<210> 44

<211> 354

<212> PRT

5 <213> Virus JC

<400> 44

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Arg Lys Asp Pro Val Gln Val
 1 5 10 15
 Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
 20 25 30
 Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
 35 40 45
 Gly Asp Pro Asp Glu His Phe Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile
 50 55 60
 Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Lys Asp Met Leu Pro Cys
 65 70 75 80

ES 2 842 425 T3

Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
 85 90 95
 Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
 100 105 110
 Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Thr
 115 120 125
 His Asp Asn Gly Ala Ala Lys Pro Val Gln Gly Thr Ser Phe His Phe
 130 135 140
 Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu Gln Gly Val Val Phe Asn
 145 150 155 160
 Tyr Arg Thr Thr Tyr Pro Asp Gly Thr Ile Phe Pro Lys Asn Ala Thr
 165 170 175
 Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His Lys Ala Tyr Leu Asp Lys
 180 185 190
 Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val Pro Asp Pro Thr Arg Asn
 195 200 205
 Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr Gly Gly Glu Asn Val Pro
 210 215 220
 Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu
 225 230 235 240
 Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp Asn Leu Tyr Leu Ser Ala
 245 250 255
 Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg Ser Gly Ser Gln Gln Trp
 260 265 270
 Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln Leu Arg Lys Arg Arg Val
 275 280 285
 Lys Asn Pro Tyr Pro Ile Ser Phe Leu Leu Thr Asp Leu Ile Asn Arg
 290 295 300
 Arg Thr Pro Arg Val Asp Gly Gln Pro Met Tyr Gly Met Asp Ala Gln
 305 310 315 320
 Ile Glu Glu Val Arg Val Phe Glu Gly Thr Glu Gln Leu Pro Gly Asp
 325 330 335
 Pro Asp Met Met Arg Tyr Val Asp Arg Tyr Gly Gln Leu Gln Thr Lys
 340 345 350

Met Leu

<210> 45

<211> 354

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 45

ES 2 842 425 T3

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Arg Lys Asp Pro Val Gln Val
1 5 10 15

Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
20 25 30

Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
35 40 45

Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe Ser Asn Ser Ile Ser Ile
50 55 60

Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Lys Asp Met Leu Pro Cys
65 70 75 80

Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
85 90 95

Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
100 105 110

Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Thr
115 120 125

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

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

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

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

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

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

Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu

ES 2 842 425 T3

225		230		235		240
Phe Gly Val Gly Pro	Leu Cys Lys Gly Asp	Asn Leu Tyr Leu Ser Ala	245	250	255	
Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg Ser Gly Ser Gln Gln Trp	260	265		270		
Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln Leu Arg Lys Arg Arg Val	275	280		285		
Lys Asn Pro Tyr Pro Ile Ser Phe Leu Leu Thr Asp Leu Ile Asn Arg	290	295		300		
Arg Thr Pro Arg Val Asp Gly Gln Pro Met Tyr Gly Met Asp Ala Gln	305	310		315		320
Ile Glu Glu Val Arg Val Phe Glu Gly Thr Glu Gln Leu Pro Gly Asp	325	330		335		
Pro Asp Met Met Arg Tyr Val Asp Arg Tyr Gly Gln Leu Gln Thr Lys	340	345		350		

Met Leu

<210> 46

<211> 245

<212> PRT

5

<213> Virus JC

<400> 46

ES 2 842 425 T3

Phe Leu Thr Pro Glu Met Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe
 1 5 10 15
 Ser Lys Ser Ile Ser Ile Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn
 20 25 30
 Lys Asp Met Leu Pro Cys Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn
 35 40 45
 Leu Asn Glu Asp Leu Thr Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val
 50 55 60
 Thr Leu Lys Thr Glu Val Leu Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His
 65 70 75 80
 Ser Asn Gly Gln Ala Thr His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln
 85 90 95
 Gly Thr Ser Phe His Phe Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu
 100 105 110
 Gln Gly Val Val Phe Asn Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile
 115 120 125
 Phe Pro Lys Asn Ala Thr Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His
 130 135 140
 Lys Ala Tyr Leu Asp Lys Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val
 145 150 155 160
 Pro Asp Pro Thr Arg Asn Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr
 165 170 175
 Gly Gly Glu Asn Val Pro Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr
 180 185 190
 Thr Val Leu Leu Asp Glu Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp
 195 200 205
 Asn Leu Tyr Leu Ser Ala Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asp Arg
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gln Gln Trp Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln
 225 230 235 240
 Leu Arg Lys Arg Arg
 245

<210> 47

5

<211> 245

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 47

ES 2 842 425 T3

Phe Leu Thr Pro Glu Met Gly Asp Pro Asp Glu His Phe Arg Gly Phe
 1 5 10 15
 Ser Lys Ser Ile Ser Ile Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn
 20 25 30
 Lys Asp Met Leu Pro Cys Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn
 35 40 45
 Leu Asn Glu Asp Leu Thr Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val
 50 55 60
 Thr Leu Lys Thr Glu Val Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His
 65 70 75 80
 Ser Asn Gly Gln Ala Thr His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln
 85 90 95
 Gly Thr Ser Phe His Phe Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu
 100 105 110
 Gln Gly Val Val Phe Asn Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile
 115 120 125
 Phe Pro Lys Asn Ala Thr Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His
 130 135 140
 Lys Ala Tyr Leu Asp Lys Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val
 145 150 155 160
 Pro Asp Pro Thr Arg Asn Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr
 165 170 175
 Gly Gly Glu Asn Val Pro Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr
 180 185 190
 Thr Val Leu Leu Asp Glu Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp
 195 200 205
 Asn Leu Tyr Leu Ser Ala Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gln Gln Trp Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln
 225 230 235 240
 Leu Arg Lys Arg Arg
 245

<210> 48

5

<211> 245

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 48

ES 2 842 425 T3

Phe Leu Thr Pro Glu Met Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe
 1 5 10 15
 Ser Lys Ser Ile Ser Ile Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn
 20 25 30
 Lys Asp Met Leu Pro Cys Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn
 35 40 45
 Leu Asn Glu Asp Leu Thr Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val
 50 55 60
 Thr Leu Lys Thr Glu Val Leu Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His
 65 70 75 80
 Ser Asn Gly Gln Ala Thr His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln
 85 90 95
 Gly Thr Ser Phe His Phe Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu
 100 105 110
 Gln Gly Val Val Phe Asn Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile
 115 120 125
 Phe Pro Lys Asn Ala Thr Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His
 130 135 140
 Lys Ala Tyr Leu Asp Lys Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val
 145 150 155 160
 Pro Asp Pro Thr Arg Asn Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr
 165 170 175
 Gly Gly Glu Asn Val Pro Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr
 180 185 190
 Thr Val Leu Leu Asp Glu Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp
 195 200 205
 Asn Leu Tyr Leu Ser Ala Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asp Arg
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gln Gln Trp Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln
 225 230 235 240
 Leu Arg Lys Arg Arg
 245

<210> 49

<211> 245

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 49

ES 2 842 425 T3

Phe Leu Thr Pro Glu Met Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe
 1 5 10 15
 Ser Lys Ser Ile Ser Ile Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn
 20 25 30
 Lys Asp Met Leu Pro Cys Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn
 35 40 45
 Leu Asn Glu Asp Leu Thr Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val
 50 55 60
 Thr Leu Lys Thr Glu Val Leu Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His
 65 70 75 80
 Cys Asn Gly Gln Ala Thr His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln
 85 90 95
 Gly Thr Ser Phe His Phe Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu
 100 105 110
 Gln Gly Val Val Phe Asn Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile
 115 120 125
 Phe Pro Lys Asn Ala Thr Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His
 130 135 140
 Lys Ala Tyr Leu Asp Lys Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val
 145 150 155 160
 Pro Asp Pro Thr Arg Asn Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr
 165 170 175
 Gly Gly Glu Asn Val Pro Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr
 180 185 190
 Thr Val Leu Leu Asp Glu Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp
 195 200 205
 Asn Leu Tyr Leu Ser Ala Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gln Gln Trp Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln
 225 230 235 240
 Leu Arg Lys Arg Arg
 245

<210> 50

<211> 245

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 50

ES 2 842 425 T3

Phe Leu Thr Pro Glu Met Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe
 1 5 10 15
 Ser Lys Ser Ile Ser Ile Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn
 20 25 30
 Lys Asp Met Leu Pro Cys Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn
 35 40 45
 Leu Asn Glu Asp Leu Thr Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val
 50 55 60
 Thr Leu Lys Thr Glu Val Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His
 65 70 75 80
 Ser Asn Gly Gln Ala Thr His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln
 85 90 95
 Gly Thr Ser Phe His Phe Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu
 100 105 110
 Gln Gly Val Val Phe Asn Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile
 115 120 125
 Phe Pro Lys Asn Ala Thr Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His
 130 135 140
 Lys Ala Tyr Leu Asp Lys Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val
 145 150 155 160
 Pro Asp Pro Thr Arg Asn Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr
 165 170 175
 Gly Gly Glu Asn Val Pro Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr
 180 185 190
 Thr Val Leu Leu Asp Glu Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp
 195 200 205
 Asn Leu Tyr Leu Ser Ala Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg
 210 215 220
 Ser Gly Phe Gln Gln Trp Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln
 225 230 235 240
 Leu Arg Lys Arg Arg
 245

<210> 51

5

<211> 245

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 51

ES 2 842 425 T3

Phe Leu Thr Pro Glu Met Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe
 1 5 10 15
 Ser Lys Ser Ile Ser Ile Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn
 20 25 30
 Lys Asp Met Leu Pro Cys Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn
 35 40 45
 Leu Asn Glu Asp Leu Thr Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val
 50 55 60
 Thr Leu Lys Thr Glu Val Leu Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His
 65 70 75 80
 Cys Asn Gly Gln Ala Thr His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln
 85 90 95
 Gly Thr Ser Phe His Phe Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu
 100 105 110
 Gln Gly Val Val Phe Asn Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile
 115 120 125
 Phe Pro Lys Asn Ala Thr Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His
 130 135 140
 Lys Ala Tyr Leu Asp Lys Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val
 145 150 155 160
 Pro Asp Pro Thr Arg Asn Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr
 165 170 175
 Gly Gly Glu Asn Val Pro Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr
 180 185 190
 Thr Val Leu Leu Asp Glu Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp
 195 200 205
 Asn Leu Tyr Leu Ser Ala Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gln Gln Trp Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln
 225 230 235 240
 Leu Arg Lys Arg Arg
 245

<210> 52

5

<211> 245

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 52

ES 2 842 425 T3

Phe Leu Thr Pro Glu Met Gly Asp Pro Asp Glu His Phe Arg Gly Phe
 1 5 10 15
 Ser Lys Ser Ile Ser Ile Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn
 20 25 30
 Lys Asp Met Leu Pro Cys Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn
 35 40 45
 Leu Asn Glu Asp Leu Thr Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val
 50 55 60
 Thr Leu Lys Thr Glu Val Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His
 65 70 75 80
 Ser Asn Gly Gln Ala Thr His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln
 85 90 95
 Gly Thr Ser Phe His Phe Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu
 100 105 110
 Gln Gly Val Val Phe Asn Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile
 115 120 125
 Phe Pro Lys Asn Ala Thr Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His
 130 135 140
 Lys Ala Tyr Leu Asp Lys Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val
 145 150 155 160
 Pro Asp Pro Thr Arg Asn Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr
 165 170 175
 Gly Gly Glu Asn Val Pro Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr
 180 185 190
 Thr Val Leu Leu Asp Glu Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp
 195 200 205
 Asn Leu Tyr Leu Ser Ala Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gln Gln Trp Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln
 225 230 235 240
 Leu Arg Lys Arg Arg
 245

<210> 53

5

<211> 245

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 53

ES 2 842 425 T3

Phe Leu Thr Pro Glu Met Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe
 1 5 10 15
 Ser Lys Ser Ile Ser Ile Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn
 20 25 30
 Lys Asp Met Leu Pro Cys Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn
 35 40 45
 Leu Asn Glu Asp Leu Thr Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val
 50 55 60
 Thr Leu Lys Thr Glu Val Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His
 65 70 75 80
 Ser Asn Gly Gln Ala Thr His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln
 85 90 95
 Gly Thr Ser Phe His Phe Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu
 100 105 110
 Gln Gly Val Val Phe Asn Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile
 115 120 125
 Phe Pro Lys Asn Ala Thr Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His
 130 135 140
 Lys Ala Tyr Leu Asp Lys Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val
 145 150 155 160
 Pro Asp Pro Thr Arg Asn Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr
 165 170 175
 Gly Gly Glu Asn Val Pro Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr
 180 185 190
 Thr Val Leu Leu Asp Glu Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp
 195 200 205
 Asn Leu Tyr Leu Ser Ala Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asn Arg
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gln Gln Trp Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln
 225 230 235 240
 Leu Arg Lys Arg Arg
 245

<210> 54

5

<211> 245

<212> PRT

<213> Virus JC

<400> 54

ES 2 842 425 T3

Phe Leu Thr Pro Glu Met Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe
 1 5 10 15
 Ser Lys Ser Ile Ser Ile Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn
 20 25 30
 Lys Asp Met Leu Pro Cys Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn
 35 40 45
 Leu Asn Glu Asp Leu Thr Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val
 50 55 60
 Thr Leu Lys Thr Glu Val Ile Gly Val Thr Thr Leu Met Asn Val His
 65 70 75 80
 Ser Asn Gly Gln Ala Thr His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln
 85 90 95
 Gly Thr Ser Phe His Phe Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu
 100 105 110
 Gln Gly Val Val Phe Asn Tyr Arg Thr Lys Tyr Pro Asp Gly Thr Ile
 115 120 125
 Phe Pro Lys Asn Ala Thr Val Gln Ser Gln Val Met Asn Thr Glu His
 130 135 140
 Lys Ala Tyr Leu Asp Lys Asn Lys Ala Tyr Pro Val Glu Cys Trp Val
 145 150 155 160
 Pro Asp Pro Thr Arg Asn Glu Asn Thr Arg Tyr Phe Gly Thr Leu Thr
 165 170 175
 Gly Gly Glu Asn Val Pro Pro Val Leu His Ile Thr Asn Thr Ala Thr
 180 185 190
 Thr Val Leu Leu Asp Glu Phe Gly Val Gly Pro Leu Cys Lys Gly Asp
 195 200 205
 Asn Leu Tyr Leu Ser Ala Val Asp Val Cys Gly Met Phe Thr Asp Arg
 210 215 220
 Ser Gly Ser Gln Gln Trp Arg Gly Leu Ser Arg Tyr Phe Lys Val Gln
 225 230 235 240
 Leu Arg Lys Arg Arg
 245

<210> 55

5

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO

10

<400> 55

gcagccagct atggcttac 20

<210> 56
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO
 <400> 56
 gctgccattc atgagaggat 20
 <210> 57
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO
 15 <400> 57
 cctcaatgga tgttgcctt 20
 <210> 58
 <211> 16
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO
 <400> 58
 aaaaccaaag acccct 16
 25 <210> 59
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO
 <400> 59
 ttgactcaat tacagaggta gaat 24
 <210> 60
 <211> 24
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO
<400> 60
agaaattggg taggggttt taac 24
<210> 61
5 <211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO
10 <400> 61
aggtacgcct tggctctgt gttc 24
<210> 62
<211> 22
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> OLIGONUCLEÓTIDO SINTÉTICO
<400> 62
gtgcaggcca ccagcttca tt 22
20

REIVINDICACIONES

1. Un método que comprende:
 examinar una muestra biológica de un sujeto para detectar al menos un indicio de una variante de la proteína de la cápside VP1 de VJC que comprende una sustitución del residuo de aminoácido 122, y
 en donde se determina que el sujeto tiene una mayor susceptibilidad a la LMP si la muestra comprende al menos un indicio.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además examinar la muestra biológica para detectar al menos un indicio de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante que comprende una sustitución de al menos uno de los residuos de aminoácidos 2 y 66.
3. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende además examinar la muestra biológica para detectar al menos un indicio de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante que comprende una delección de uno o más de los fragmentos de aminoácidos 50-51, 54-55 y 123-125.
4. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende además examinar la muestra biológica para detectar al menos un indicio de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante que comprende una sustitución de al menos uno de los residuos de aminoácidos 55, 60, 265, 267 y 269.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la muestra se examina usando un ensayo capaz de detectar al menos un indicio de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante que comprende una sustitución en el residuo de aminoácido 122, en donde se determina que el sujeto tiene una mayor susceptibilidad a la LMP si la muestra comprende al menos un indicio.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la muestra se examina usando un ensayo que también puede detectar:
 (i) al menos un indicio de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante que comprende una sustitución de al menos uno de los residuos de aminoácidos 2 y 66;
 (ii) al menos un indicio de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante que comprende una delección de uno o más de los fragmentos de aminoácidos 50-51, 54-55 y 123-125; y/o
 (iii) al menos un indicio de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante que comprende una sustitución de al menos uno de los residuos de aminoácidos 55, 60, 265, 267 y 269,
 y en donde se determina que el sujeto tiene una mayor susceptibilidad a la LMP si la muestra comprende al menos un indicio de las proteínas de la cápside VP1 de VJC variantes.
7. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en: una muestra de sangre, una muestra de LCR y una muestra de orina.
8. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde se sabe que el sujeto ha sido previamente infectado con un VJC de tipo salvaje.
9. El método de la reivindicación 8, en donde se examina una nueva muestra biológica del sujeto para detectar al menos un indicio de al menos una proteína de la cápside VP1 de VJC variante al menos dos veces al año.
10. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la detección de al menos un indicio de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante se usa para identificar al sujeto como inapropiado para un tratamiento inmunosupresor.
11. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la detección de al menos un indicio de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante se usa para recomendar una modificación de un tratamiento inmunosupresor para el sujeto.
12. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la ausencia de indicios de una proteína de la cápside VP1 de VJC variante se usa para identificar al sujeto como apropiado para un tratamiento inmunosupresor o para un tratamiento inmunosupresor continuado.
13. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la muestra biológica se examina para detectar la presencia de un anticuerpo que es específico para una proteína de la cápside VP1 de VJC variante; una proteína de la cápside VP1 de VJC variante; y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside VP1 de VJC variante.
14. El método de la reivindicación 13, en donde la muestra biológica se examina usando un análisis basado en ELISA.

```

          10      20      30      40      50      60      70      80
JCV  VP1  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
SV40 COA1 MAPTKRKGER KDPVQVPKLL IRGGVEVLEV KTGVDSITEV ECFLTPEMGD PDEHLRGFSK SISISDTFES DSPNKDMLPC
          90      100     110     120     130     140     150     160
JCV  VP1  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
SV40 COA1 --PKKPK--- -BPVQVPKLV IKGGIEVLGV KTGVDSPTEV ECFLNPQMGN PDEHQKGLSK SLAAEKQFTD DSPDKQQLPC
          170     180     190     200     210     220     230     240
JCV  VP1  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
SV40 COA1 YSVARIPLPN LNEDLTCGNI LMWEAVTLKT EVIGVTTLMN VHSNGQATHD NGAAKPVQGT SFHFFSVGGE ALELQGVVFN
          250     260     270     280     290     300     310     320
JCV  VP1  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
SV40 COA1 YSVARIPLPN INEDLTCGNI LMWEAVTVKT EVIGVTAMLN LHSQTQKTHE NGAGKPIQGS NFHFFAVGGE PLELQGVLAN
          170     180     190     200     210     220     230     240
JCV  VP1  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
SV40 COA1 YRTTYPDGTI FPKNATVQSQ VMNTEHKAYL DKNKAYPVEC WVPDPTRNEN TRYFGTLTGG ENVPPVLHIT NTATTVLLDE
          250     260     270     280     290     300     310     320
JCV  VP1  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
SV40 COA1 YRTRKPAQTV TPKNATVDSQ QMNTDHKAVL DKNAYPVEC WVPDPSKNEN TRYFGTYTGG ENVPPVLHIT NTATTVLLDE
          250     260     270     280     290     300     310     320
JCV  VP1  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
SV40 COA1 FGVGPLCKGD NLYLSAVDVC GMFTNRSQS QWRGLSRYFK VQLRKRVRKN PYPISFLLTD LINRRTPRVD GQPMYGMDAQ
          330     340     350
JCV  VP1  ....|....| ....|....| ....|....| ....
SV40 COA1 QGVGPLCKAD SLYVSAVDIC GLFTNTSGTQ QWKGLPRYFK ITLRKRVRKN PYPISFLLSD LINRRTQVRD GQPMIGMSSQ
          330     340     350
JCV  VP1  ....|....| ....|....| ....|....| ....
SV40 COA1 VEEVRVFEGT EQLPGDPDMM RYVDRYGQLQ TKML
          330     340     350
JCV  VP1  ....|....| ....|....| ....|....| ....
SV40 COA1 VEEVRVYEDT EELPGDPDMI RYIDFEGQTT TRMQ

```

Fig. 1



Fig. 2

VP1 de Muestras de Cerebro de sujetos con LMP:

>AAB60584 gi|1161319|gb|AAB60584.1| VP1
 NVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSQQRGLSRYFKVQLRKRVRKN
 PYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRVFEGTEELPGDPDMMRYVDRYQQLQTKML
 (SEQ ID NO: 3)

>AAB60586 gi|1161322|gb|AAB60586.1| VP1
 NVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSQQRGLSRYFKVQLRKRVRKN
 PYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRVFEGTEELPGDPDMMRYVDRYQQLQTKML
 (SEQ ID NO: 4)

>AAB62687 gi|2246615|gb|AAB62687.1| VP1 [virus JC]
 MAPTKRKGKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGDSITEVECFLTPMGDPDEHFRGFSKSISSDTE
 SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTTLMNVHSNGQAAHDNGAGKPVQ
 GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWPDPTR
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSQQRGLS
 RYFKVQLRKRVRKNPYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRVFEGTEELPGDPDMMRYVDR
 YGQLQTKML
 (SEQ ID NO: 5)

>AAB94036 gi|2735983|gb|AAB94036.1| VP1 [virus JC]
 MAPTKRKGKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGDSITEVECFLTPMGDPDEHFRGFSKSISSDTE
 SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ
 GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNRYRTTYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWPDPTR
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSQQRGLS
 RYFKVQLRKRVRKNPYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRVFEGTEELPGDPDMMRYVDR
 YGQLQTKML
 (SEQ ID NO: 6)

>BAA01965 gi|425206|dbj|BAA01965.1| VP1 [poliomavirus JC]
 MAPTKRKGKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGDSITEVECFLTPMGDPDEHLRGSKSISSDTE
 SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTTLMNVHSNGQAAHDNGAGKPVQ
 GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWPDPTR
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSQQRGLS
 RYFKVQLRKRVRKNPYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRVFEGTEELPGDPDMMRYVDR
 YGQLQTKML
 (SEQ ID NO: 7)

>BAA01966 gi|425207|dbj|BAA01966.1| VP1 [poliomavirus JC]
 MAPTKRKGKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGDSITEVECFLTPMGDPDEHLRGSKSISSHTFE
 SDSPNRDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTSMLNVHSNGQATHDNGAGKPVQ
 GTSFHFFSVGGEALELQGVLFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWPDPTR
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSQQRGLS
 RYFKVQLRKRVRKNPYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRVFEGTEELPGDPDMMRYVDR
 YGQLQTKML
 (SEQ ID NO: 8)

>BAA01967 gi|425208|dbj|BAA01967.1| VP1 [poliomavirus JC]
 MAPTKRKGKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGDSITEVECFLTPMGDPDEHLRGSKSISSDTE
 SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTSMLNVHSNGQATHDNGAGKPVQ
 GTSFHFFSVGGEALELQGVLFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWPDPTR
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRLGSQQRGLS
 RYFKVQLRKRVRKNPYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRVFEGTEELPGDPDMMRYVDR
 YGQLQTKML
 (SEQ ID NO: 9)

Fig. 3-1

>BAA01968 gi|425209|dbj|BAA01968.1| VP1 [poliomavirus JC]
MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGDSITEVECFLLTPMGGDPDEHLRGFSSKSSISISDTFE
SDSPSKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTTLMNVHSNGQAAHDNGAGKPVQ
GTSFHFSSVGGAELELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPTR
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLVLSAVDVCGMFTNRSQSQQWRGLS
RYFKVQLRKRVRKPNYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRFVFEETELPGDPDMMRYVDR
YGQLQTKML
(SEQ ID NO: 10)

>BAA01969 gi|425210|dbj|BAA01969.1| VP1 [poliomavirus JC]
MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGDSITEVECFLLTPMGGDPDEHLRGFSSKSSISISDTFE
SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVLGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ
GTSFHFSSVGGAELELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPTR
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLVLSAVDVCGMFTNRSQSGFQQWRGLS
RYFKVQLRKRVRKPNYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRFVFEETELPGDPDMMRYVDR
YGQLQTKML
(SEQ ID NO: 11)

>BAA01970 gi|425211|dbj|BAA01970.1| VP1 [poliomavirus JC]
MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGDSITEVECFLLTPMGGDPDEHLRGFSSKSSISISDTFE
SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVLGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ
GTSFHFSSVGGAELELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPTR
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLVLSAVDVCGMFTNRSQSQQWRGLS
RYFKVQLRKRVRKPNYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRFVFEETELPGDPDMMRYVDR
YGQLQTKML
(SEQ ID NO: 12)

>BAA05636 gi|538231|dbj|BAA05636.1| VP1 (proteína de la cápside)[poliomavirus
JC]
MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGDSITEVECFLLTPMGGDPDEHLRGFSSKSSISISDTFE
SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVLGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ
GTSFHFSSVGGAELELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPTR
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLVLSAVDVCGMFTNRSQSQQWRGLS
RYFKVQLRKRVRKPNYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRFVFEETELPGDPDMMRYVDR
YGQLQTKML
(SEQ ID NO: 13)

>BAA05637 gi|538234|dbj|BAA05637.1| VP1 (proteína de la cápside)[poliomavirus
JC]
MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGDSITEVECFLLTPMGGDPDEHLRGFSSKSSISISDTFE
SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVLGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ
GTSFHFSSVGGAELELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPTR
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLVLSAVDVCGMFTNRSQSGFQQWRGLS
RYFKVQLRKRVRKPNYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRFVFEETELPGDPDMMRYVDR
YGQLQTKML
(SEQ ID NO: 14)

>BAA05638 gi|538238|dbj|BAA05638.1| VP1 (proteína de la cápside)[poliomavirus
JC]
MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGDSITEVECFLLTPMGGDPDEHLRGFSSKSSISISDTFE
SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ
GTSFHFSSVGGAELELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPTR
NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLVLSAVDVCGMFTNRSQSGYQQWRGLS
RYFKVQLRKRVRKPNYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRFVFEETELPGDPDMMRYVDR
YGQLQTKML
(SEQ ID NO: 15)

Fig. 3-2

>BAB11728 gi|9796436|dbj|BAB11728.1| proteína de la cápside VP1 [poliomavirus JC]
 MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGDSITEVECFLETPMGGDPDEHLRFGFSKISISISDTFE
 SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVLGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ
 GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKGDNLVLSAVDVCGMFTNRSQFQQRGLS
 RYFKVQLRKRVRKPNYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRVFEGTEELPGDPDMMRYVDR
 YGQLQTKML
 (SEQ ID NO: 16)

>BAB11734 gi|9796443|dbj|BAB11734.1| proteína de la cápside VP1 [poliomavirus JC]
 MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGDSITEVECFLETPMGGDPDEHLRFGFSKISISISDTFE
 SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ
 GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKGDNLVLSAVDVCGMFTNRSQYQQRGLS
 RYFKVQLRKRVRKPNYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRVFEGTEELPGDPDMMRYVDR
 YGQLQTKML
 (SEQ ID NO: 17)

>BAE00111 gi|67968154|dbj|BAE00111.1| VP1 [poliomavirus JC]
 MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGDSITEVECFLETPMGGDPDEHLRFGFSKISISISDTFE
 SDSPSKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTSMLNVHSNGQAAHDNGAGKPVQ
 GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKGDNLVLSAVDVCGMFTNRSQSQQRGLS
 RYFKVQLRKRVRKPNYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRVFEGTEELPGDPDMMRYVDR
 YGQLQTKML
 (SEQ ID NO: 18)

>BAE00117 gi|67968161|dbj|BAE00117.1| VP1 [poliomavirus JC]
 MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGDSITEVECFLETPMGGDPDEHLRFGFSKISISISDTFE
 SDSPSKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTSMLNVHSNGQAAHDNGAGKPVQ
 GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKGDNLVLSAVDVCGMFTNRSQFQQRGLS
 RYFKVQLRKRVRKPNYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRVFEGTEELPGDPDMMRYVDR
 YGQLQTKML
 (SEQ ID NO: 19)

>BAE00123 gi|67968168|dbj|BAE00123.1| VP1 [poliomavirus JC]
 MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGDSITEVECFLETPMGGDPDEHLRFGFSKISISISDTFE
 SDSPSKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTSMLNVHSNGQAAHDNGAGKPVQ
 GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTR
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKGDNLVLSAVDVCGMFTNRSQFQQRGLS
 RYFKVQLRKRVRKPNYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRVFEGTEELPGDPDMMRYVDR
 YGQLQTKML
 (SEQ ID NO: 20)

>BAE00127 gi|67968173|dbj|BAE00127.1| VP2 [poliomavirus JC]
 MGAALALLGDLVATVSEAAAATGFSVAEIAAGEAAATIEVEIASLATVEGITSTSEIAIAAIGLTPETYA
 VITGAPGAVAGFAALVQTVTGGSAIAQLGYRFFADWDHKVSTVGLFQQPAMALQLFNPEDYYDILFPGV
 NAFVNNIHYLDPRHWGPSLSTISQAFWNLVRDDLPSLTSQEIQRRTQKLFVESLARFLEETTWAIVNS
 PVNLYNYSIDYYSRLSPVRPMSMRQVAQREGTYISFGHSYTQSIDDADSIQEVTRQLDLKTPNVQSGEF
 IEKSIAPGGANQRSAPQWMLPLLLGLYGTVTPALEAYEDGPNKKRRRKEGPRASSKTSYKRRSRSSRS
 (SEQ ID NO: 21)

Fig. 3-3

>BAE00129 gi|67968175|dbj|BAE00129.1| VP1 [poliovirus JC]
 MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGVDSITEVECFLETPMGDPDEHLRGFSKISISIDTFE
 SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ
 GTSFHFFSVGGAELELQGVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPDTR
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQWRGLS
 RYFKVQLRKRVRVKNPYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRVFEGTEELPGDPDMMRYVDR
 YGQLQTKML
 (SEQ ID NO: 22)

>BAE00135 gi|67968182|dbj|BAE00135.1| VP1 [poliovirus JC]
 MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGVDSITEVECFLETPMGDPDEHLRGFSKLISSIDTFE
 SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ
 GTSFHFFSVGGAELELQGVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPDTR
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQWRGLS
 RYFKVQLRKRVRVKNPYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRVFEGTEELPGDPDMMRYVDR
 YGQLQTKML
 (SEQ ID NO: 23)

>BAE00141 gi|67968189|dbj|BAE00141.1| VP1 [poliovirus JC]
 MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGVDSITEVECFLETPMGDPDEHLRGFSKISISIDTFE
 SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ
 GTSFHFFSVGGAELELQGVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPDTR
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQWRGLS
 RYFKVQLRKRVRVKNPYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRVFEGTEELPGDPDMMRYVDR
 YGQLQTKML
 (SEQ ID NO: 24)

>BAE00147 gi|67968204|dbj|BAE00147.1| VP1 [poliovirus JC]
 MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGVDSITEVECFLETPMGDPDEHLRGFSKISISIDTFE
 SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVLGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ
 GTSFHFFSVGGAELELQGVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPDTR
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQWRGLS
 RYFKVQLRKRVRVKNPYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRVFEGTEELPGDPDMMRYVDR
 YGQLQTKML
 (SEQ ID NO: 25)

>BAE00153 gi|67968211|dbj|BAE00153.1| VP1 [poliovirus JC]
 MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGVDSITEVECFLETPMGDPDEHLRGFSKISISIDTFE
 SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVLGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ
 GTSFHFFSVGGAELELQGVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPDTR
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSGYQWRGLS
 RYFKVQLRKRVRVKNPYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRVFEGTEELPGDPDMMRYVDR
 YGQLQTKML
 (SEQ ID NO: 26)

>BAE00159 gi|67968218|dbj|BAE00159.1| VP1 [poliovirus JC]
 MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGVDSITEVECFLETPMGDPDEHLRGFSMSISISIDTFE
 SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVLGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ
 GTSFHFFSVGGAELELQGVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPDTR
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSGSQWRGLS
 RYFKVQLRKRVRVKNPYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRVFEGTEELPGDPDMMRYVDR
 YGQLQTKML
 (SEQ ID NO: 27)

Fig. 3-4

>BAE00165 gi|67968225|dbj|BAE00165.1| VP1 [poliomavirus JC]
 MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGDSITEVEECFLTPEMGDPDEHLRGFSSKISISISDTFE
 SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVLGVTTLMNVHCNGQATHDNGAGKPVQ
 GTSFHFFSVGGAELELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPDTR
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSQSQQWRGLS
 RYFKVQLRKRVRKNPYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRVFEGTEELPGDPMRYVDR
 YGQLQTKML
 (SEQ ID NO: 28)

>BAE00171 gi|67968232|dbj|BAE00171.1| VP1 [poliomavirus JC]
 MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGDSITEVEECFLTPEMGDPDEHLRGFSSKISISISDTFE
 SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVLGVTTLMNVHCNGQATHDNGAGKPVQ
 GTSFHFFSVGGAELELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPDTR
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSQSQQWRGLS
 RYFKVQLRKRVRKNPYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRVFEGTEELPGDPMRYVDR
 YGQLQTKML
 (SEQ ID NO: 29)

>BAE02837 gi|68445619|dbj|BAE02837.1| proteína VP1 [poliomavirus JC]
 FLTPEMGDPDEHLRGFSSKISISISDTFESDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE
 VIGVTTLMNVHNSNGQATHDNGAGKPVQGTSTFHFFSVGGAELELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPDTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKG
 DNLYLSAVDVCGMFTNRSQSQQWRGLSRYFKVQLRKR
 (SEQ ID NO: 30)

>BAE02838 gi|68445621|dbj|BAE02838.1| proteína VP1 [poliomavirus JC]
 FLTPEMGDPDEHLRGFSSKISISISHTFESDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE
 VIGVTTLMNVHNSNGQATHDNGAGKPVQGTSTFHFFSVGGAELELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPDTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKG
 DNLYLSAVDVCGMFTNRSQSQQWRGLSRYFKVQLRKR
 (SEQ ID NO: 31)

>BAE02839 gi|68445623|dbj|BAE02839.1| proteína VP1 [poliomavirus JC]
 FLTPEMGDPDEHLRGFSSKISISISNTFESDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE
 VIGVTTLMNVHNSNGQATHDNGAGKPVQGTSTFHFFSVGGAELELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPDTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKG
 DNLYLSAVDVCGMFTNRSQSQQWRGLSRYFKVQLRKR
 (SEQ ID NO: 32)

>BAE02840 gi|68445625|dbj|BAE02840.1| proteína VP1 [poliomavirus JC]
 FLTPEMGDPDEHLRGFSEISISISHTFESDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE
 VIGVTTLMNVHNSNGQATHDNGAGKPVQGTSTFHFFSVGGAELELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPDTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKG
 DNLYLSAVDVCGMFTNRSQSQQWRGLSRYFKVQLRKR
 (SEQ ID NO: 33)

>BAE02841 gi|68445627|dbj|BAE02841.1| proteína VP1 [poliomavirus JC]
 FLTPEMGDPDEHLRGFSSKISISISDTFESDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE
 VLGVTTLMNVHNSNGQATHDNGAGKPVQGTSTFHFFSVGGAELELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPDTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKG
 DNLYLSAVDVCGMFTNRFSGSQWRGLSRYFKVQLRKR
 (SEQ ID NO: 34)

Fig. 3-5

>BAE02842 gi|68445629|dbj|BAE02842.1| proteina VP1 [poliomavirus JC]
 FLTPMGDPDEHLRGFSSISISDTEFESDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE
 VIGVTTLMNVHNSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGAELELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG
 DNLYLSAVDVCGMFTNRSQWRGLSRYFKVQLRKR
 (SEQ ID NO: 35)

>BAE02843 gi|68445631|dbj|BAE02843.1| proteina VP1 [poliomavirus JC]
 FLTPMGDPDEHLRGFSSISISHTFESDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE
 VIGVTTLMNVHNSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGAELELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG
 DNLYLSAVDVCGMFTNRSQWRGLSRYFKVQLRKR
 (SEQ ID NO: 36)

>BAE02844 gi|68445633|dbj|BAE02844.1| proteina VP1 [poliomavirus JC]
 FLTPMGDPDEHLRGFSSISISDTEFESDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE
 VLGVTTLMNVHNSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGAELELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG
 DNLYLSAVDVCGMFTNRSQWRGLSRYFKVQLRKR
 (SEQ ID NO: 37)

>BAE02845 gi|68445635|dbj|BAE02845.1| proteina VP1 [poliomavirus JC]
 FLTPMGDPDEHLRGFSSISISDTEFESDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE
 VLGVTTLMNVHNSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGAELELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG
 DNLYLSAVDVCGMFTNRSQWRGLSRYFKVQLRKR
 (SEQ ID NO: 38)

>BAE02846 gi|68445637|dbj|BAE02846.1| proteina VP1 [poliomavirus JC]
 FLTPMGDPDEHLRGFSSISISDTEFESDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE
 VIGVTTLMNVHNSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGAELELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTRNENTRYFGTLTGGENAPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG
 DNLYLSAVDVCGMFTNRSQWRGLSRYFKVQLRKR
 (SEQ ID NO: 39)

>BAE02847 gi|68445639|dbj|BAE02847.1| proteina VP1 [poliomavirus JC]
 FLTPMGDPDEHLRGFSSISISDTEFSDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE
 VIGVTTLMNVHNSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGAELELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKG
 DNLYLSAVDVCGMFTNRSQWRGLSRYFKVQLRKR
 (SEQ ID NO: 40)

VP1 de Muestras no de Cerebro de sujetos con LMP:

>AAB62680 gi|2246607|gb|AAB62680.1| VP1 [virus JC]
 MAPTKRKGERKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGDSITEVECFLTPMGDPDEHLRGFSSISISDTEF
 SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTTLMNVHNSNGQAAHDNGAGKPVQ
 GTSFHFFSVGGAELELQGVVFNYRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVPDPT
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFGVGPLCKGDNLYLSAVDVCGMFTNRSQWRGLS
 RYFKVQLRKRVRKPNYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQVEEVRFEGTEELPGDPMRYVDR
 YGQLQTKML
 (SEQ ID NO: 41)

Fig. 3-6

>AAT09819 gi|47078338|gb|AAT09819.1| VP1 [virus JC]
 MAPTKRKGERRKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGVDSITEVECFLTPEMGDPDEHLRFGFSKISISISDTFE
 SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVLGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQ
 GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRRTKYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPTR
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKGDNLVLSAVDVCGMFTNRSGSQWRGLS
 RYFKVQLRKRVRKPNPYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQIEEVRVFEGTEELPGDPDMMRYVDR
 YGQLQTKML
 (SEQ ID NO: 42)

>AAT09825 gi|47078345|gb|AAT09825.1| VP1 [virus JC]
 MAPTKRKGERRKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGVDSITEVECFLTPEMGDPDEHLRFGFSKISISISDTFE
 SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAAKPVQ
 GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRRTTYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPTR
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKGDNLVLSAVDVCGMFTNRFGSQWRGLS
 RYFKVQLRKRVRKPNPYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQIEEVRVFEGTEQLPGDPDMMRYVDR
 YGQLQTKML
 (SEQ ID NO: 43)

>AAT09831 gi|47078352|gb|AAT09831.1| VP1 [virus JC]
 MAPTKRKGERRKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGVDSITEVECFLTPEMGDPDEHFRGFSKISISISDTFE
 SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAAKPVQ
 GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRRTTYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPTR
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKGDNLVLSAVDVCGMFTNRSGSQWRGLS
 RYFKVQLRKRVRKPNPYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQIEEVRVFEGTEQLPGDPDMMRYVDR
 YGQLQTKML
 (SEQ ID NO: 44)

>AAT09837 gi|47078359|gb|AAT09837.1| VP1 [virus JC]
 MAPTKRKGERRKDPVQVPKLLIRGGVEVLEVKTVGVDSITEVECFLTPEMGDPDEHLRFGFSNSISISISDTFE
 SDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTEVIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAAKPVQ
 GTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRRTTYPDGTIFPKNATVQSQVMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPTR
 NENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKGDNLVLSAVDVCGMFTNRSGSQWRGLS
 RYFKVQLRKRVRKPNPYPISFLLTDLINRRTPRVDGQPMYGMDAQIEEVRVFEGTEQLPGDPDMMRYVDR
 YGQLQTKML
 (SEQ ID NO: 45)

>BAE02848 gi|68445641|dbj|BAE02848.1| proteína VP1 [poliomavirus JC]
 FLTPEMGDPDEHLRFGFSKISISISDTFESDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE
 VLGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRRTKYPDGTIFPKNATVQSQ
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKG
 DNLVLSAVDVCGMFTDRSGSQWRGLSRYFKVQLRKR
 (SEQ ID NO: 46)

>BAE02849 gi|68445643|dbj|BAE02849.1| proteína VP1 [poliomavirus JC]
 FLTPEMGDPDEHFRGFSKISISISDTFESDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE
 VIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNYRRTKYPDGTIFPKNATVQSQ
 VMNTEHKAYLDKNKAYPVECWVDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKG
 DNLVLSAVDVCGMFTNRSGSQWRGLSRYFKVQLRKR
 (SEQ ID NO: 47)

Fig. 3-7

>BAE02850 gi|68445645|dbj|BAE02850.1| proteina VP1 [poliomavirus JC]
 FLTPEMGDPDEHLRGFSKSISSISDTFESDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE
 VLGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ
 VMNTEHKAYLDDKNKAYPVECWVDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKG
 DNLYL SAVDVCGMFTDRSGSQWRGLSRYFKVQLRKRR
 (SEQ ID NO: 48)

>BAE02851 gi|68445647|dbj|BAE02851.1| proteina VP1 [poliomavirus JC]
 FLTPEMGDPDEHLRGFSKSISSISDTFESDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE
 VLGVTTLMNVHCNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ
 VMNTEHKAYLDDKNKAYPVECWVDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKG
 DNLYL SAVDVCGMFTNRSGSQWRGLSRYFKVQLRKRR
 (SEQ ID NO: 49)

>BAE02852 gi|68445649|dbj|BAE02852.1| proteina VP1 [poliomavirus JC]
 FLTPEMGDPDEHLRGFSKSISSISDTFESDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE
 VIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ
 VMNTEHKAYLDDKNKAYPVECWVDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKG
 DNLYL SAVDVCGMFTNRSGFQQWRGLSRYFKVQLRKRR
 (SEQ ID NO: 50)

>BAE02853 gi|68445651|dbj|BAE02853.1| proteina VP1 [poliomavirus JC]
 FLTPEMGDPDEHLRGFSKSISSISDTFESDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE
 VLGVTTLMNVHCNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ
 VMNTEHKAYLDDKNKAYPVECWVDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKG
 DNLYL SAVDVCGMFTNRSGSQWRGLSRYFKVQLRKRR
 (SEQ ID NO: 51)

>BAE02854 gi|68445653|dbj|BAE02854.1| proteina VP1 [poliomavirus JC]
 FLTPEMGDPDEHFRGFSKSISSISDTFESDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE
 VIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ
 VMNTEHKAYLDDKNKAYPVECWVDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKG
 DNLYL SAVDVCGMFTNRSGSQWRGLSRYFKVQLRKRR
 (SEQ ID NO: 52)

>BAE02855 gi|68445655|dbj|BAE02855.1| proteina VP1 [poliomavirus JC]
 FLTPEMGDPDEHLRGFSKSISSISDTFESDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE
 VIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ
 VMNTEHKAYLDDKNKAYPVECWVDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKG
 DNLYL SAVDVCGMFTNRSGSQWRGLSRYFKVQLRKRR
 (SEQ ID NO: 53)

>BAE02856 gi|68445657|dbj|BAE02856.1| proteina VP1 [poliomavirus JC]
 FLTPEMGDPDEHLRGFSKSISSISDTFESDSPNKDMLPCYSVARIPLPNLNEDLTCGNILMWEAVTLKTE
 VIGVTTLMNVHSNGQATHDNGAGKPVQGTSFHFFSVGGEALELQGVVFNRYRTKYPDGTIFPKNATVQSQ
 VMNTEHKAYLDDKNKAYPVECWVDPTRNENTRYFGTLTGGENVPPVLHITNTATTVLLDEFVGVPLCKG
 DNLYL SAVDVCGMFTDRSGSQWRGLSRYFKVQLRKRR
 (SEQ ID NO: 54)

Fig. 3-8

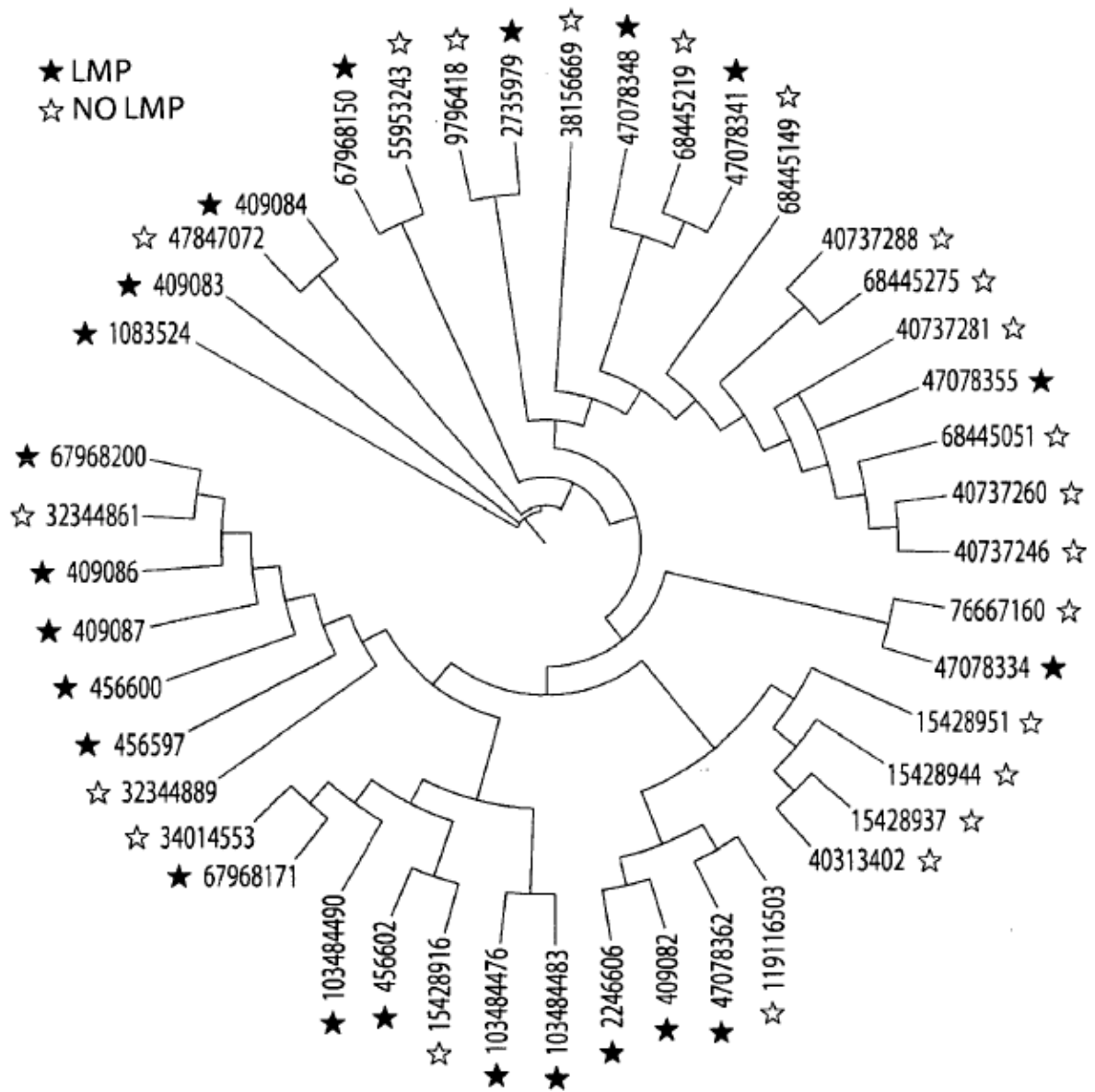


Fig. 4A

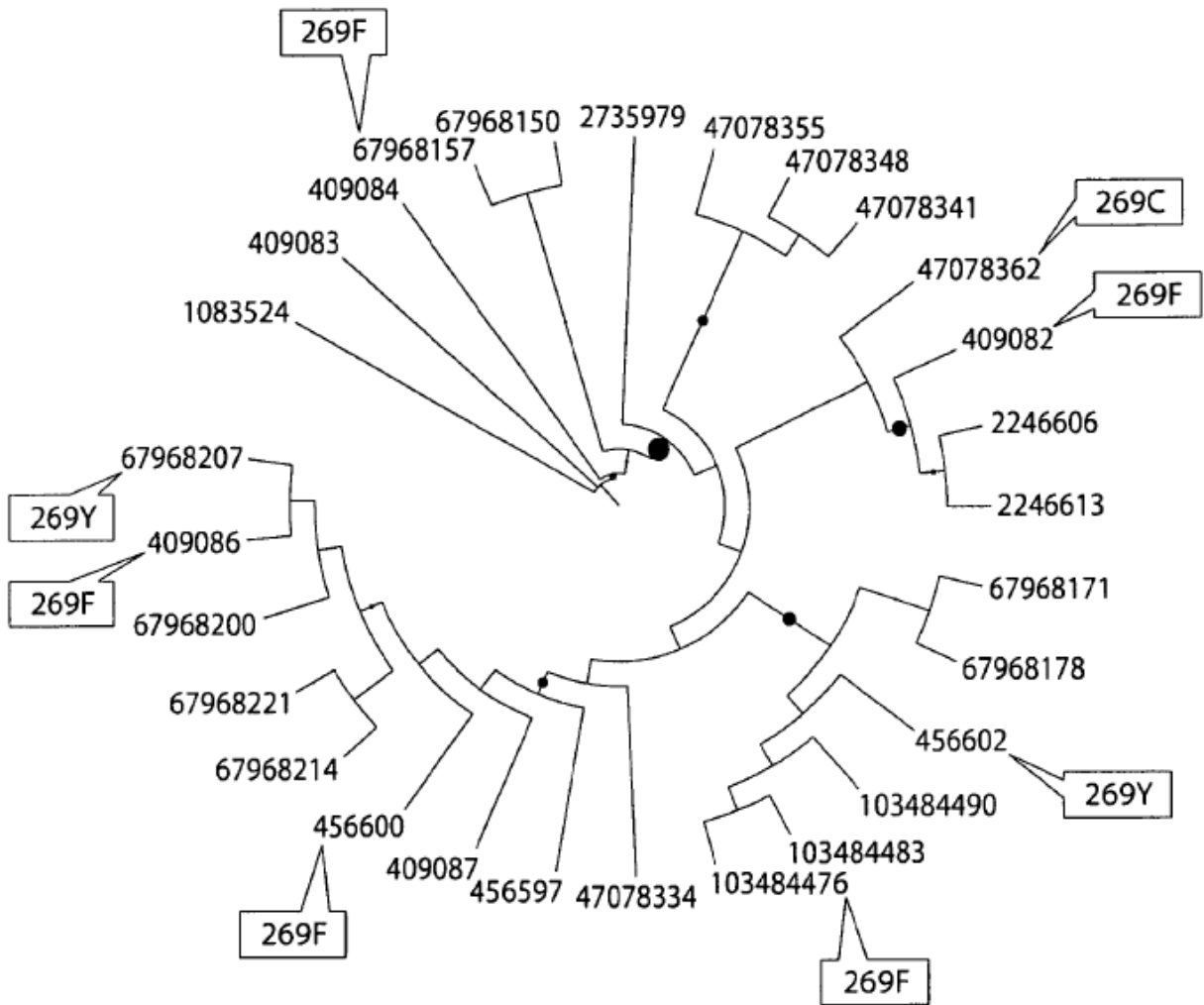


Fig. 4B



Fig. 5A



Fig. 5B

MICROFOTOGRAFÍAS ELECTRÓNICAS DE PARTÍCULAS SIMILARES A VIRUS (VLP) USADAS EN ENSAYO DE HEMAGLUTINACIÓN.

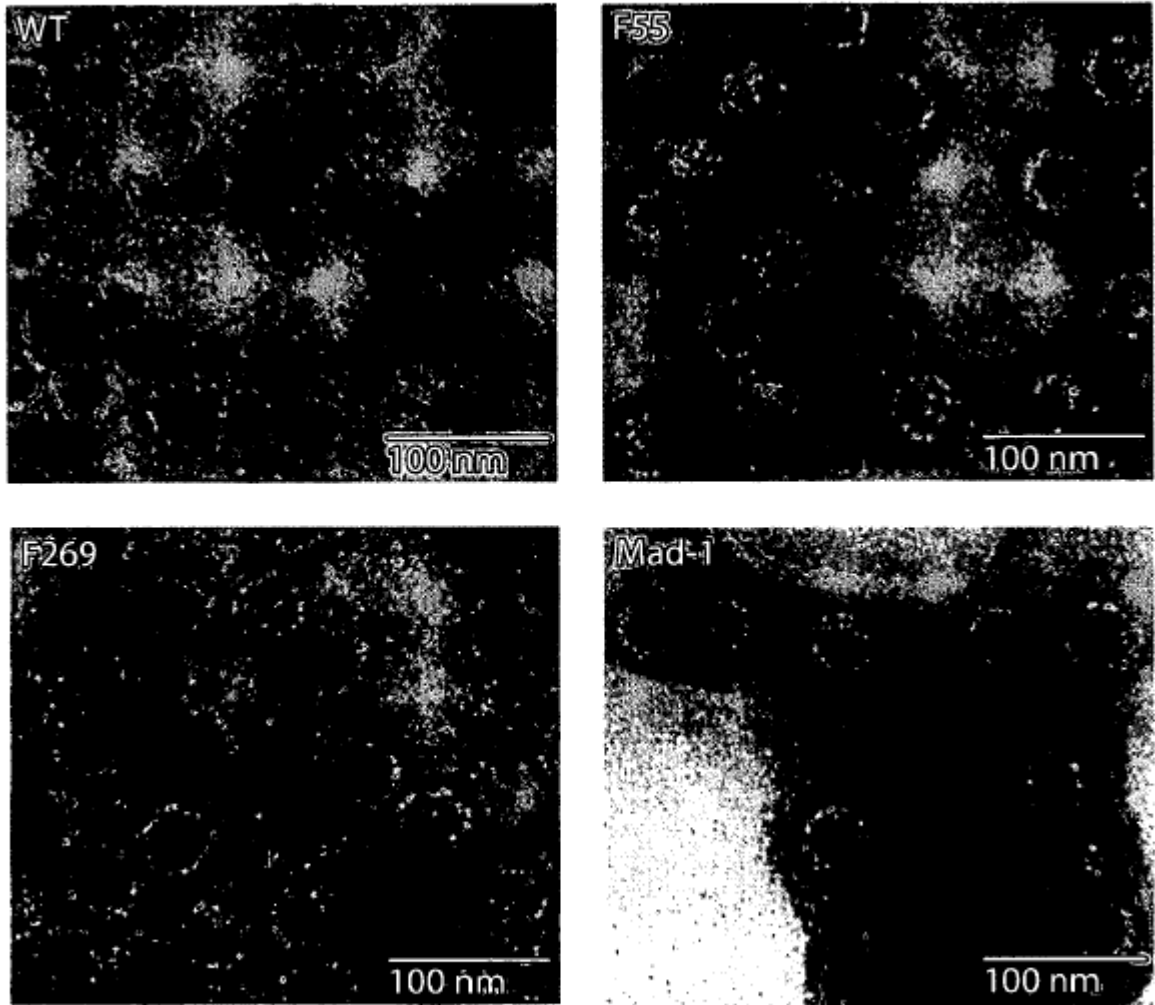


Fig. 6

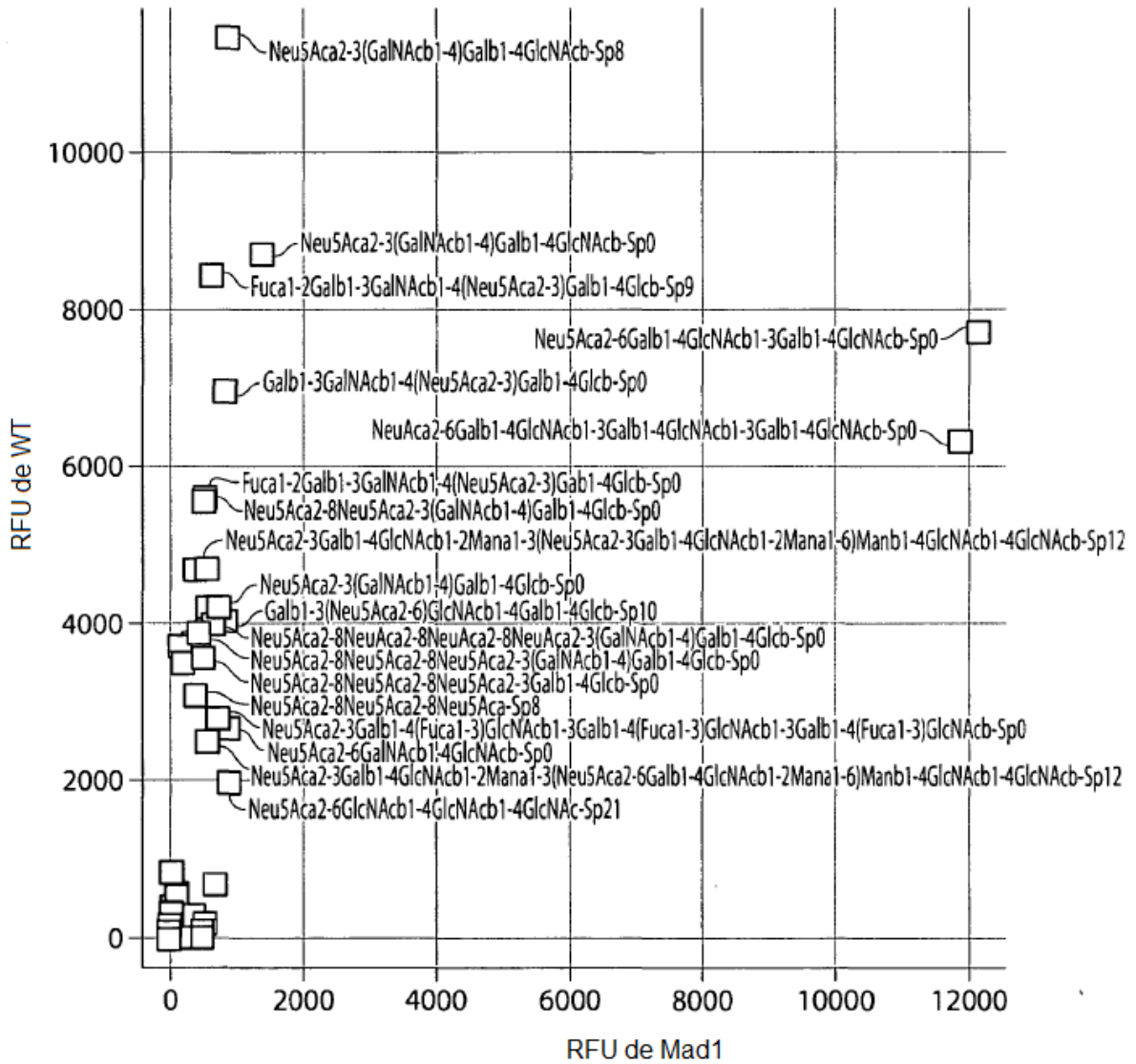


Fig. 7

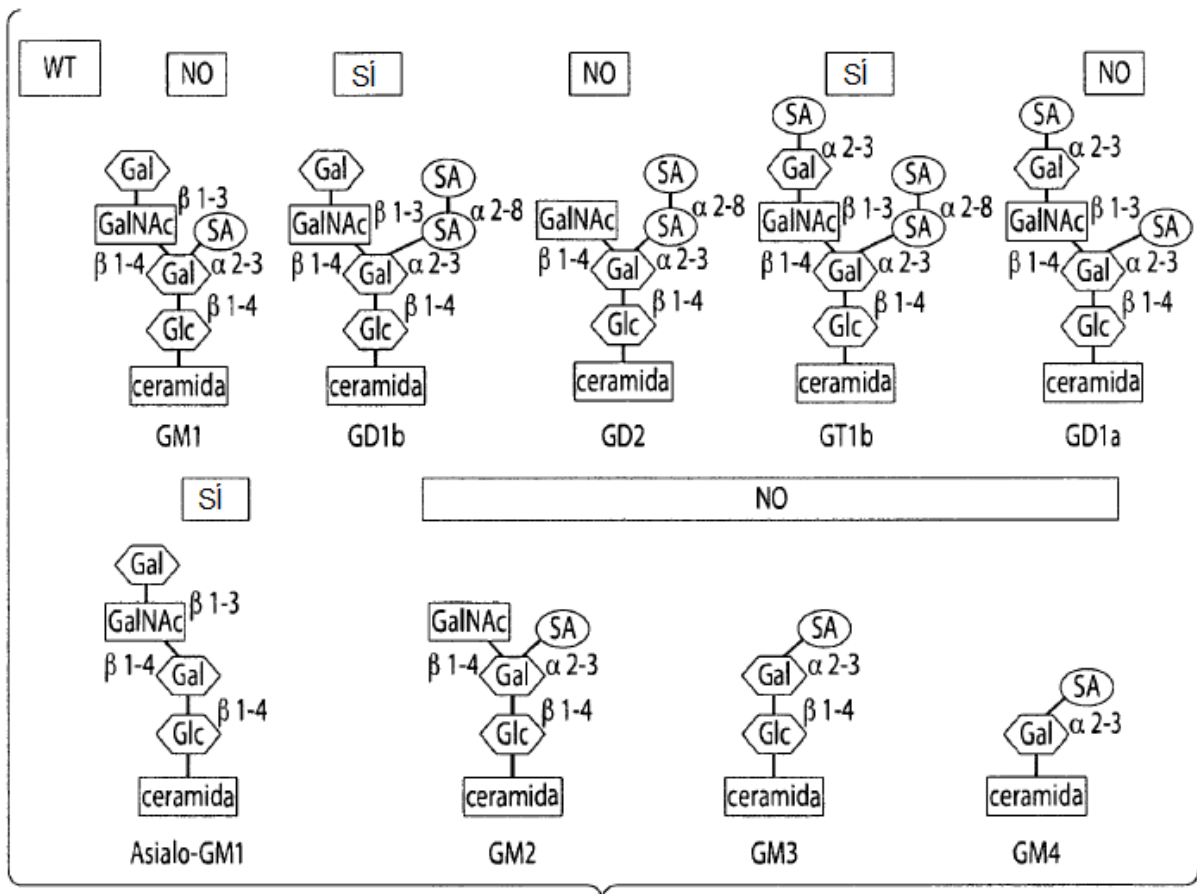


Fig. 8

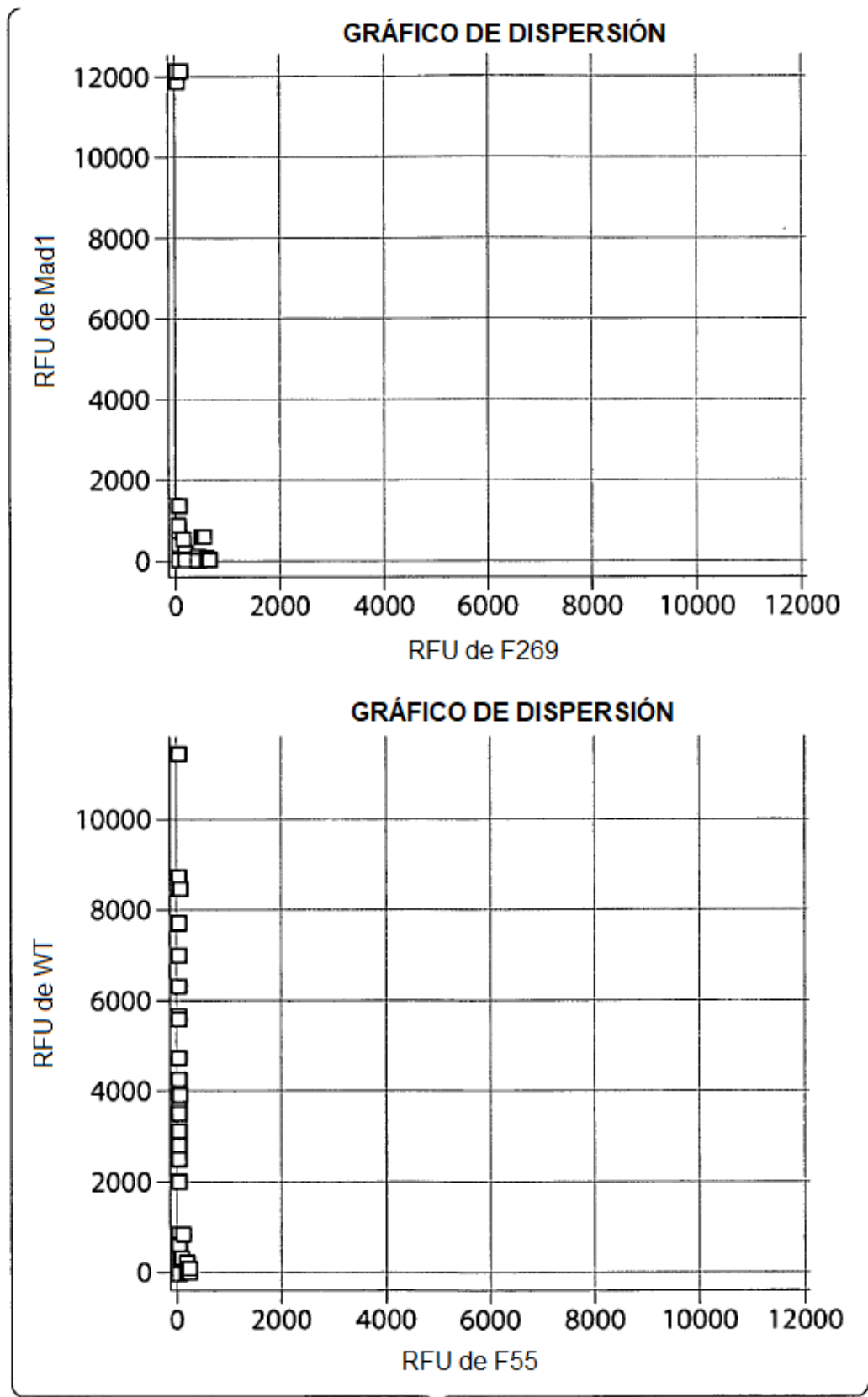


Fig. 9

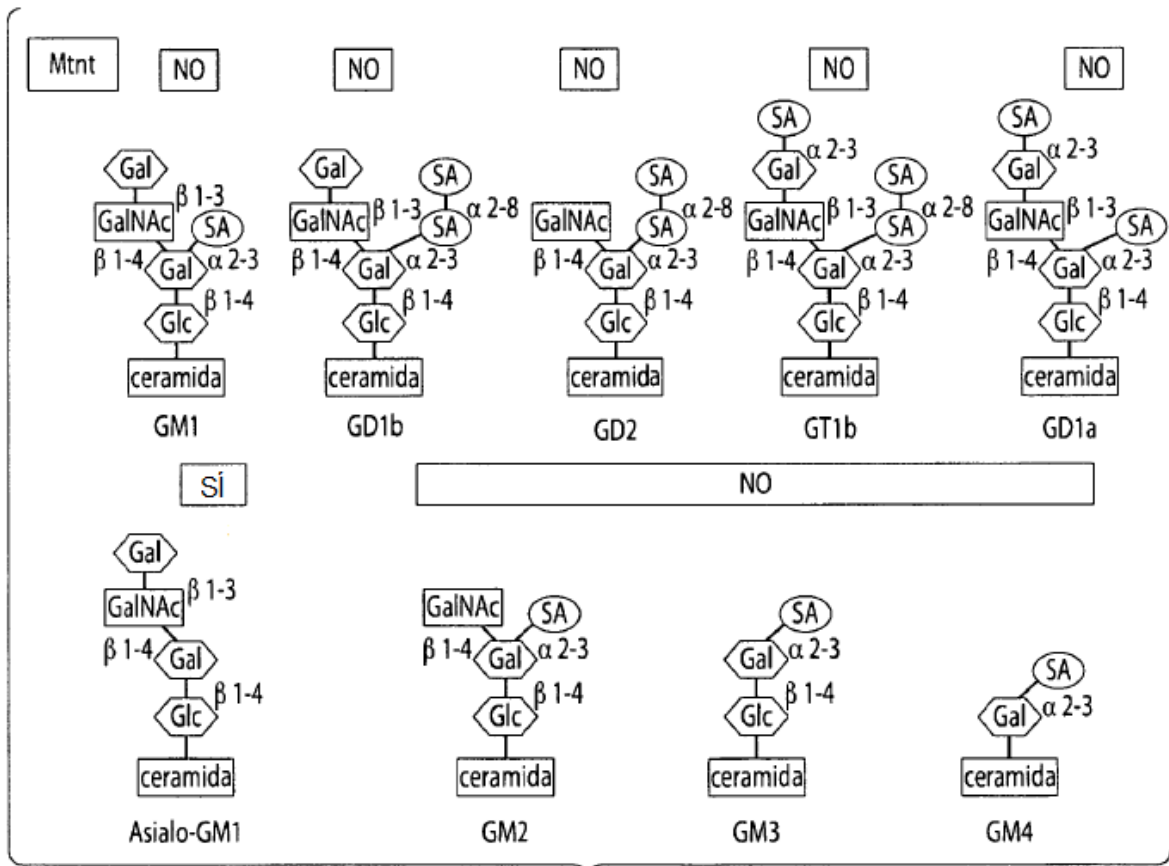


Fig. 10

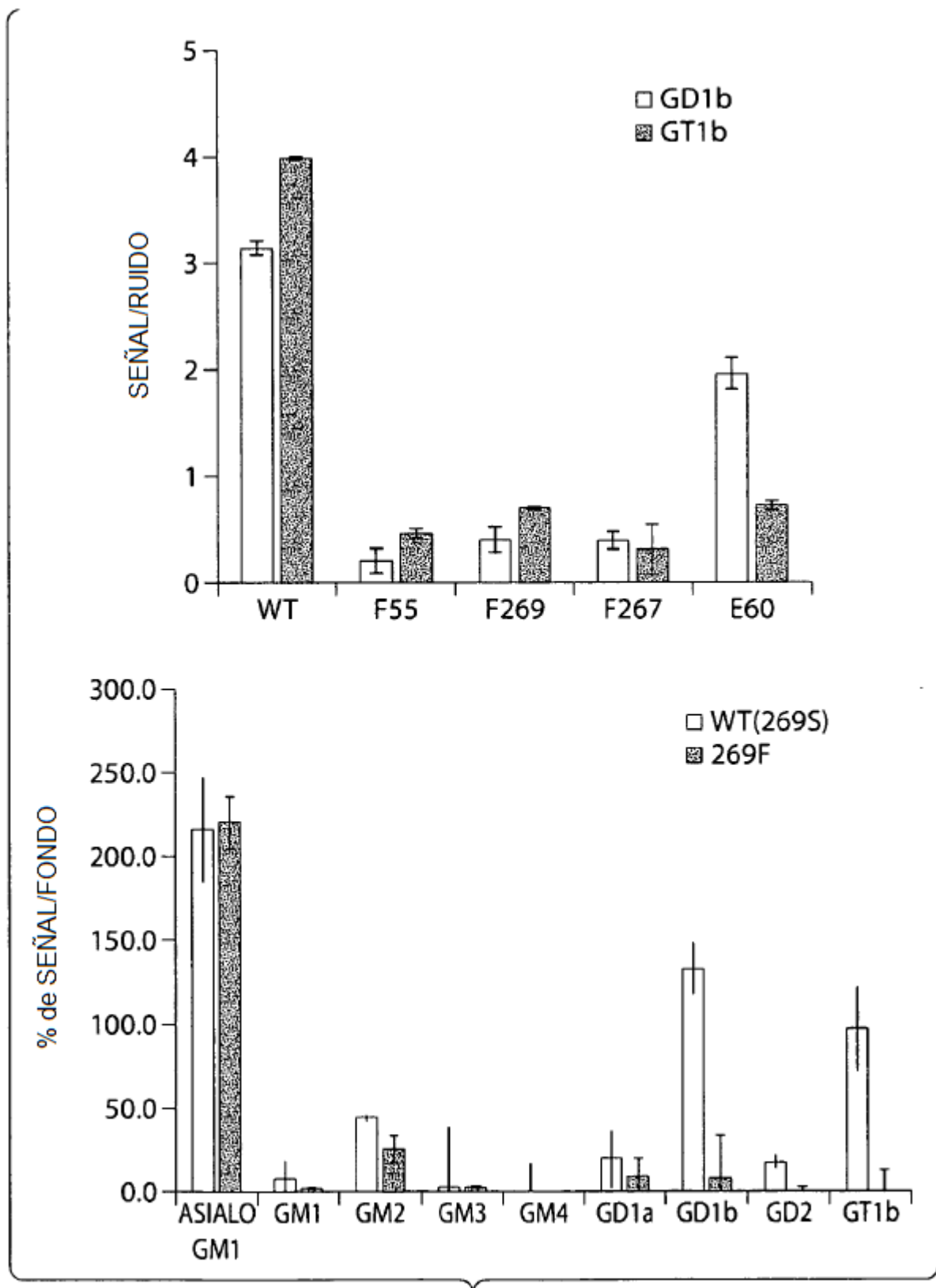


Fig. 11

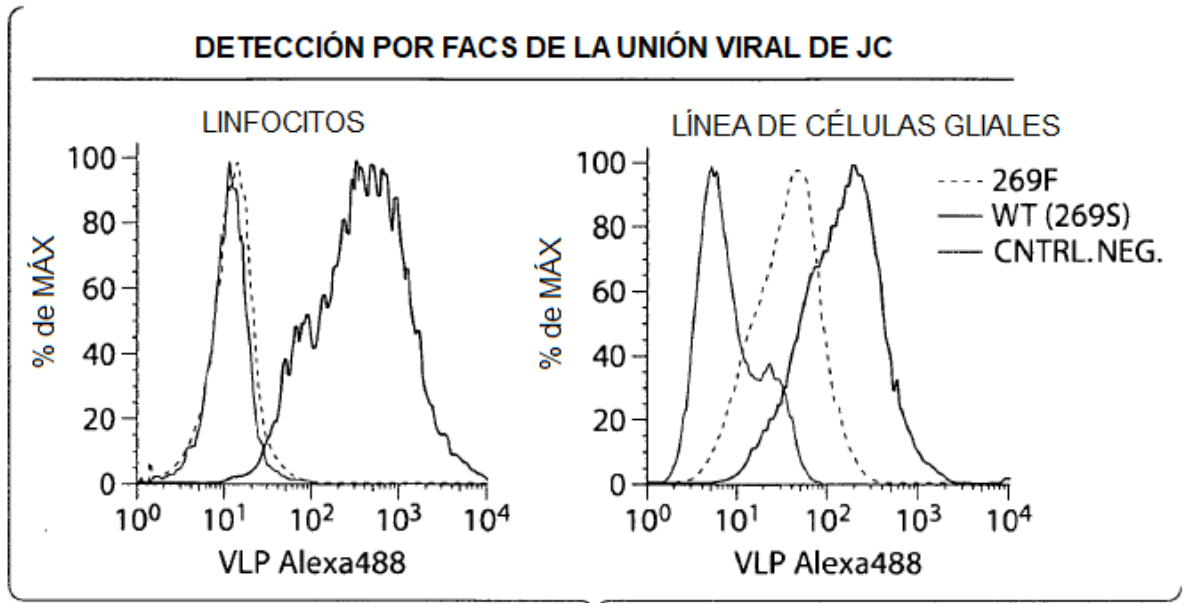


Fig. 12

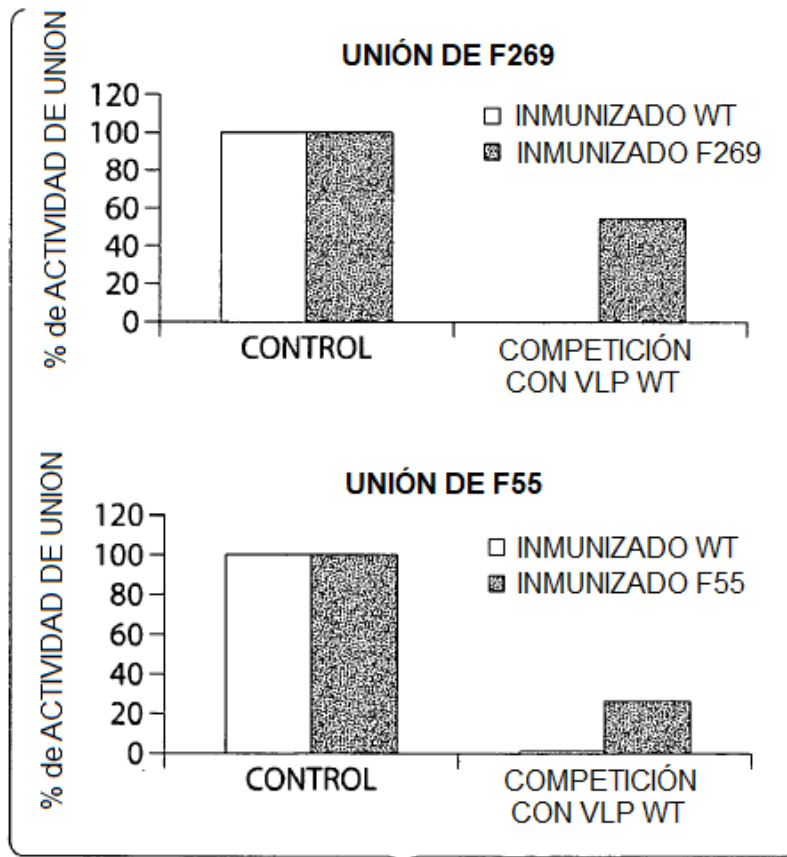


Fig. 13

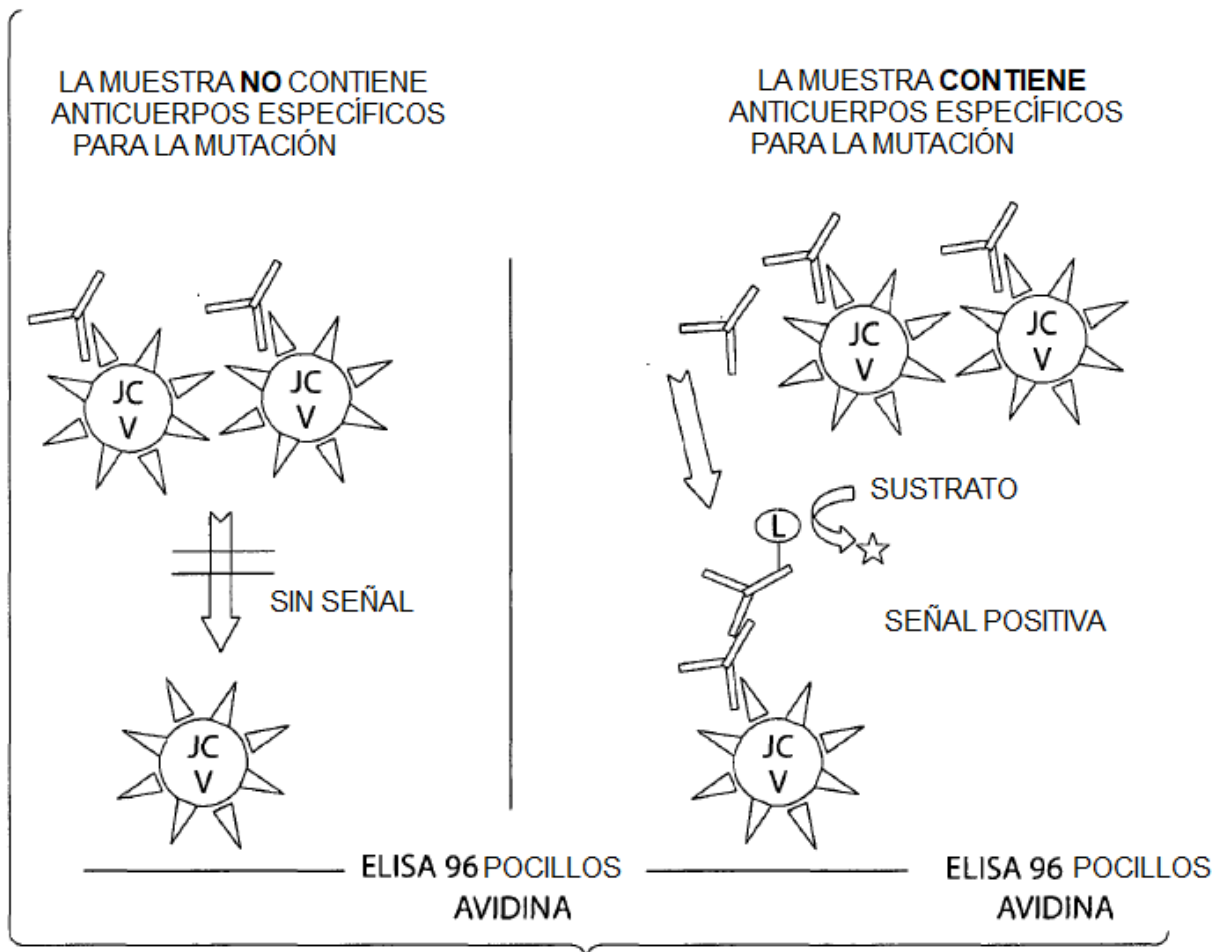


Fig. 14

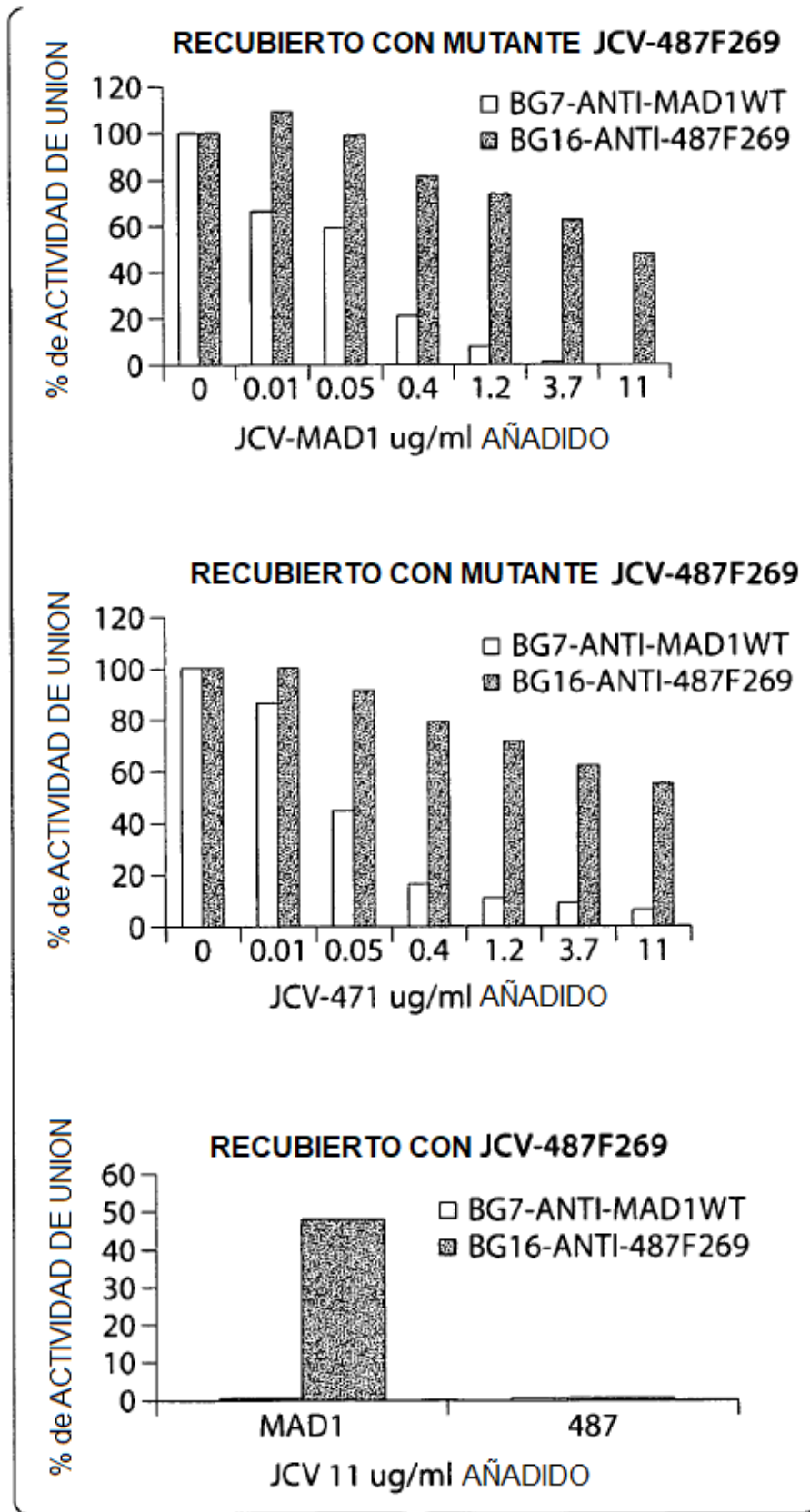


Fig. 15

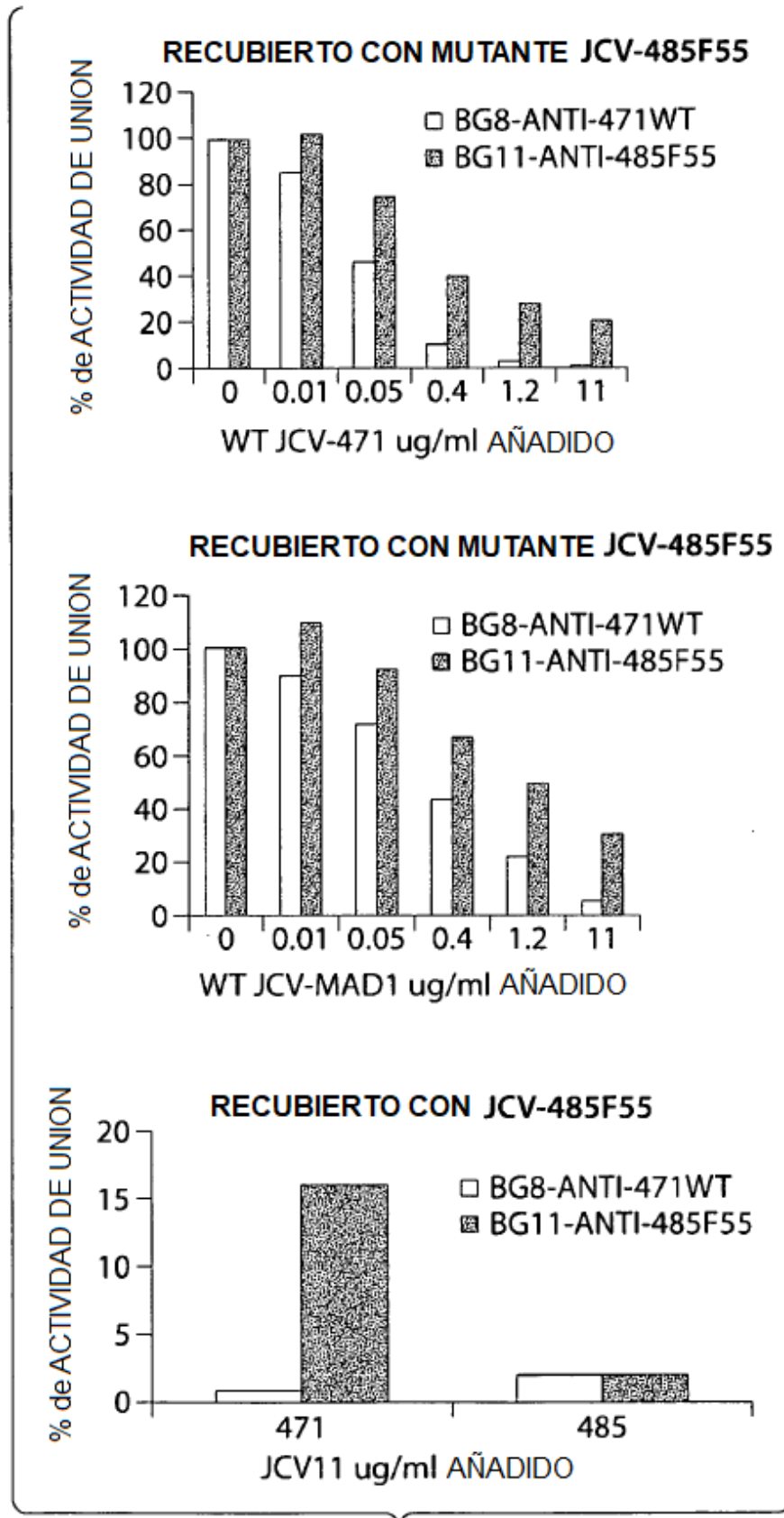


Fig. 16

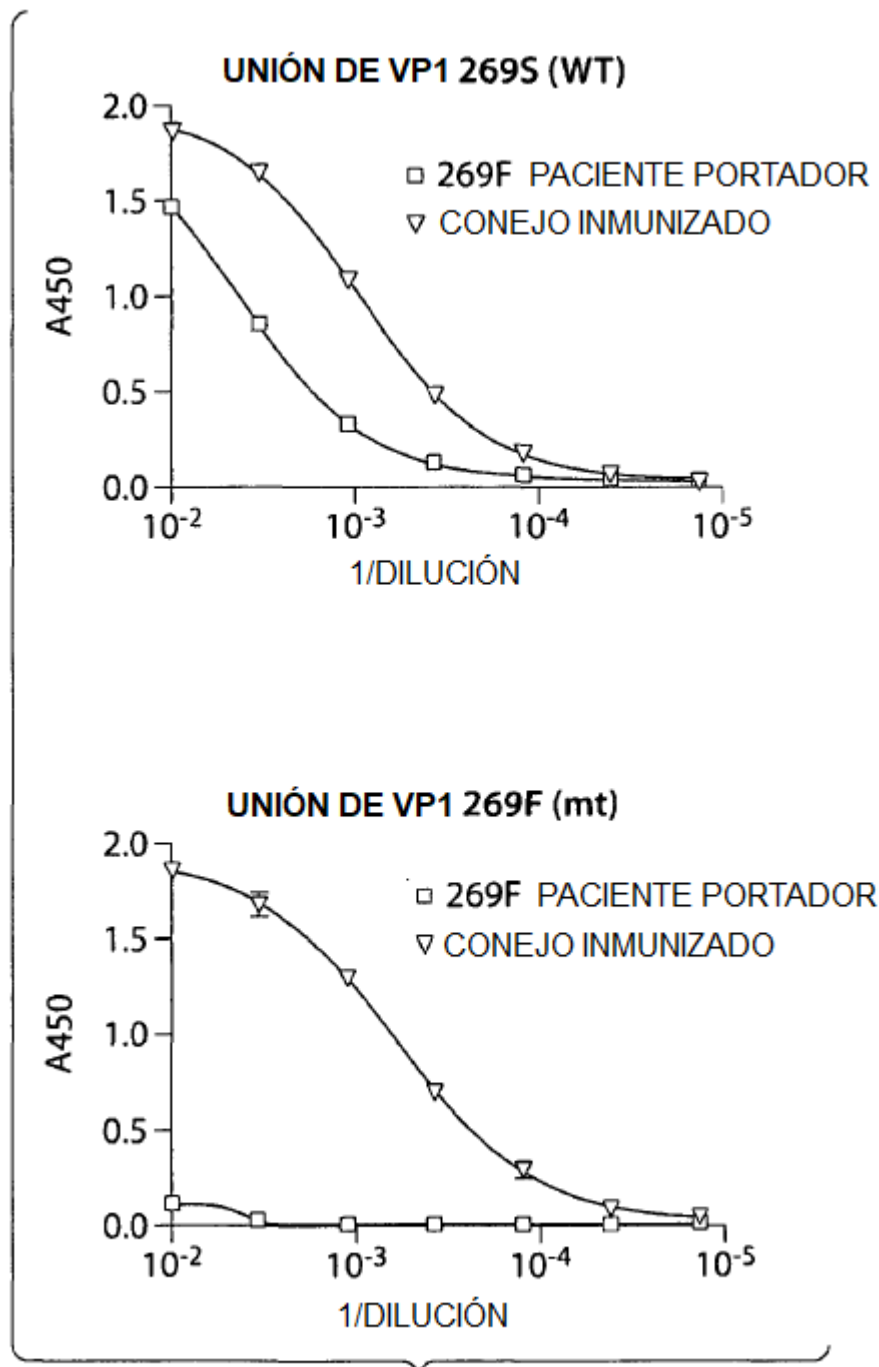


Fig. 17

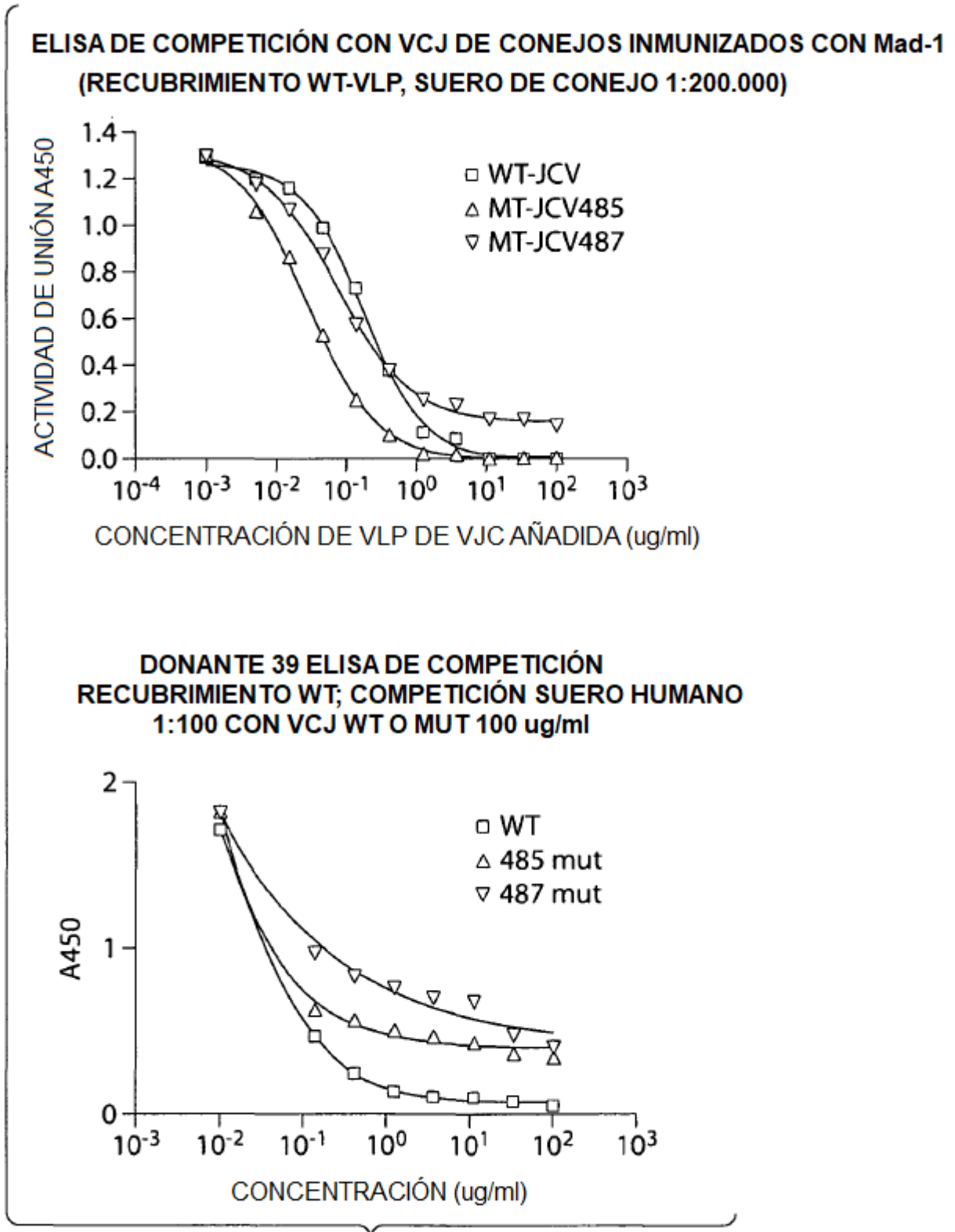


Fig. 18

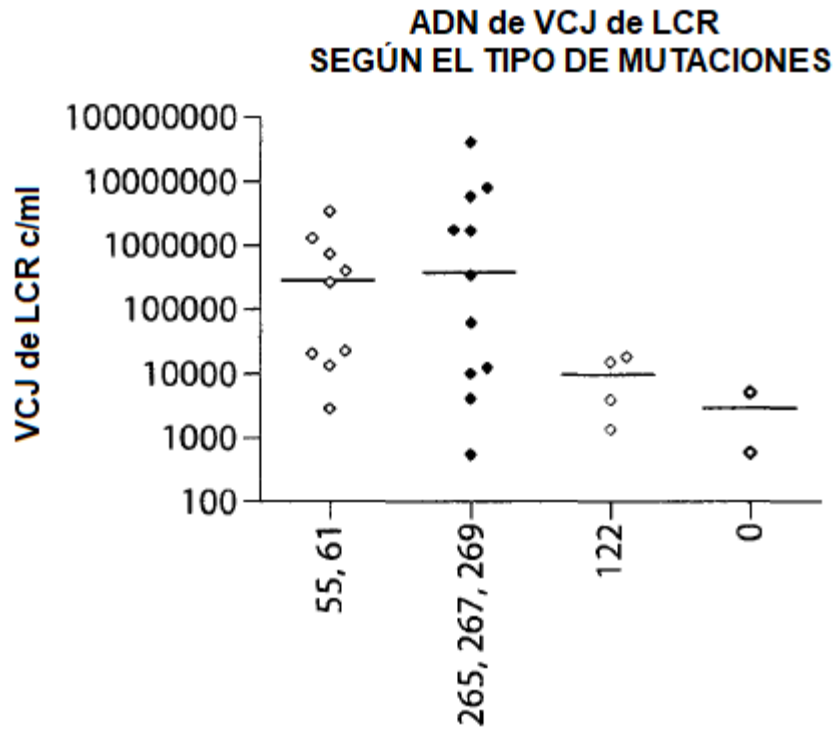


Fig. 19

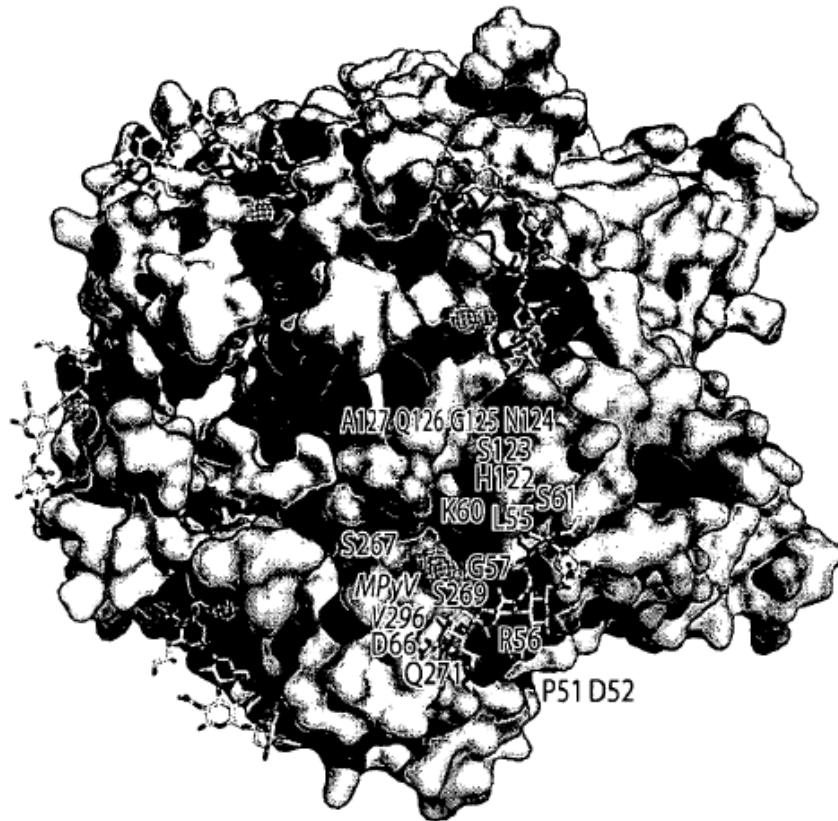


Fig. 20A

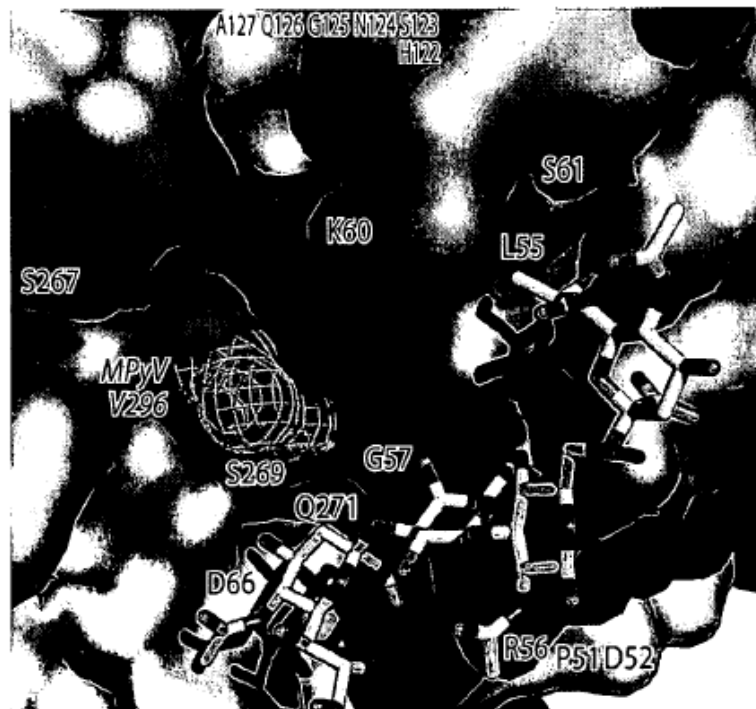


Fig. 20B

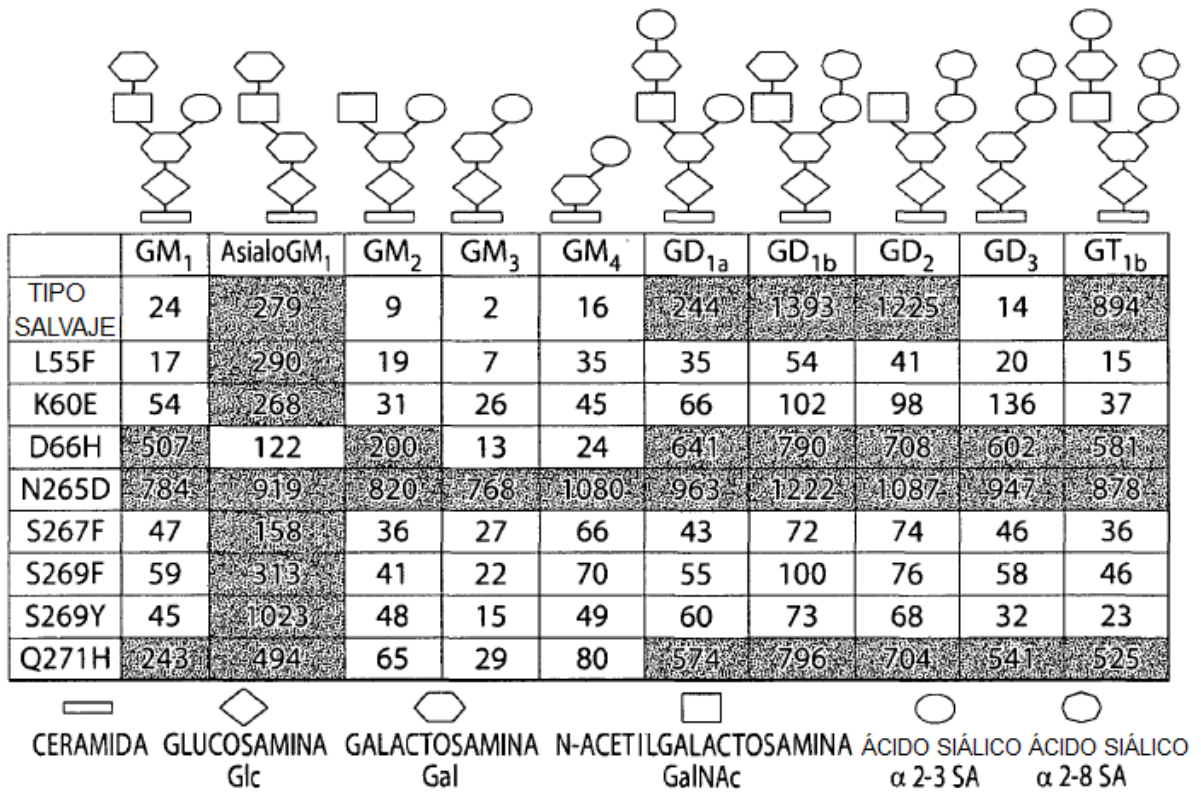


Fig. 21