

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 710**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/005** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2005** **E 09174552 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015** **EP 2149583**

54 Título: **Proteínas capsidiales VP1 modificadas del parvovirus B19**

30 Prioridad:

**24.09.2004 EP 04450180**

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

**19.01.2016**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)  
Lichtstrasse 35  
4002 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**MODROW, SUSANNE;  
LOWIN, TORSTEN;  
MÖBS, MARKUS y  
BRÖKER, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 556 710 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

Proteínas capsidiales VP1 modificadas del parvovirus B19

La presente invención se refiere a proteínas y partículas capsidiales del parvovirus B19 modificadas, a sus usos y a la preparación de medicamentos que incluyen vacunas para el tratamiento de enfermedades asociadas al parvovirus B19.

El parvovirus B19 se descubrió en 1975 como causante de infecciones sistémicas en adultos que eran asintomáticos o tenían síntomas leves no específicos tales como cefalea, pirexia, malestar, fatiga y mialgia (1, 2, 3). En 1984 el parvovirus B19 se identificó como el agente etiológico de eritema infeccioso, también conocidos como quinta enfermedad (4). El virus se extiende a nivel mundial pero se limita exclusivamente a huéspedes humanos. Con respecto a diferencias regionales aproximadamente del 40 al 60 por ciento de la población presenta anticuerpos contra proteínas virales a los 20 años. La infección es endémica, sin embargo alcanza brotes regionales al finalizar el invierno y en la primavera. El virus es muy estable. En general se transmite por vía oral desde individuos con infección aguda (5). Además de esta vía de infección principal el virus puede transmitirse por la sangre y productos derivados de la sangre por vía parenteral y verticalmente de la madre al feto (6, 7, 8, 9). La replicación productiva masiva del parvovirus B19 tiene lugar en las células progenitoras eritroides (10). Por lo tanto durante la infección aguda la carga viral es extremadamente alta y pueden presentarse hasta  $10^{13}$  partículas y/o genomas virales por mililitro de sangre periférica. El virus se une a las células precursoras de eritrocitos usando el antígeno P del grupo sanguíneo (globósido) como el receptor celular para la adsorción (11). Se ha observado que después de la infección y la eliminación de la sangre periférica los genomas virales están presentes en las células de la médula ósea y en la piel, en las células sinoviales, en tejidos hepáticos y en el endotelio del miocardio (12, 13, 14, 15, 16, 17). Hasta ahora no está claro si estas células producen las proteínas virales y/o las partículas de B19 infecciosas y si el genoma viral puede reactivarse para la replicación productiva.

Habitualmente la infección por parvovirus B19 carece de síntomas clínicos o puede dar como resultado una enfermedad similar a la gripe. Particularmente los niños pueden padecer eritema infeccioso (quinta enfermedad), una enfermedad eruptiva autolimitada (18, 19, 20). También se ha relacionado el parvovirus B19 con un amplio espectro de enfermedades (Tabla 1): puede producirse anemia transitoria, leucocitopenia o trombocitopenia sin necesitar ninguna terapia. Sin embargo, en algunos pacientes se observó trombocitopenia grave, aplasia eritrocitaria pura o pancitopenia. Junto con estas secuelas hematológicas de hepatitis por infección aguda, también puede producirse ocasionalmente miocarditis, miositosis, lesión pulmonar aguda y enfermedades neurológicas (12, 21, 22, 23, 24). En gestantes, como manifestaciones clínicas, se ha descrito aborto espontáneo, hidrops fetal no inmune y muerte fetal intrauterina (25, 26). En gestantes no inmunes con infección aguda se ha observado un índice de mortalidad fetal de aproximadamente el 9% (9, 27). Sin embargo también hay estudios que describen un mayor porcentaje para el desarrollo de hidrops fetal en gestantes no inmunes infectadas por B19 (28). Dependiendo del estado hematológico del huésped; por ejemplo pacientes con anemia falciforme o talasemia, la infección por B19 da lugar a una crisis aplásica. La infección persistente por parvovirus B19 se ha descrito en pacientes con y sin inmunodeficiencias subyacentes (29, 30).

Además de estas manifestaciones generales la infección por parvovirus B19 puede inducir un amplio espectro de fenómenos autoinmunes. Las citopenias autoinmunes son trastornos hematológicos bien conocidos que pueden afectar a cualquier linaje celular de la médula ósea. En la inmensa mayoría de casos únicamente una de las líneas celulares se afecta. Sin embargo, se conoce la destrucción simultánea mediada autoinmune de granulocitos neutrófilos y trombocitos debido a la infección persistente por parvovirus B19 (31). El parvovirus B19 se ha identificado como un posible desencadenante en algunos casos de trombocitopenia inmune (32, 33, 34, 35). El espectro clínico de la artropatía autoinmune varía desde artralgias leves a vasculitis necrotizante severa (Tabla 1). En algunos brotes de eritema infeccioso, se han descrito generalmente artralgias y artritis. La infección por B19 puede producir una poli artropatía periférica simétrica en adultos. Normalmente los síntomas son autolimitantes pero pueden persistir durante algunos meses. Ocasionalmente, en pacientes con poliartralgia/poliartritis de larga duración se ha observado viremia combinada con anticuerpos IgM/IgG contra las proteínas VP1 y/o VP2 estructurales. Algunos de estos cumplieron con los criterios de la artritis reumatoide (AR) (26, 37). Sin embargo el desarrollo de AR después de infección aguda por parvovirus parece ser inusual (38, 39). En niños se conoce bien la relación de la infección por B19 con artritis-artralgias. Algunos de los niños afectados pueden desarrollar artritis crónica indistinguible de la artritis idiopática juvenil (40, 41, 42, 43). El espectro clínico incluye mono, oligo y poliartritis. Adicionalmente se observa frecuentemente viremia persistente en niños con artritis idiopática juvenil sistémica. En niños con diversas formas de artritis juvenil se amplificó ADN del B19 en el 57% del suero y/o del líquido sinovial de aquellos con infección previa por parvovirus B19. En muchos pacientes podría demostrarse la presencia continua de partículas virales e inmunocomplejos en la sangre periférica así como en el líquido sinovial (44). A pesar del desarrollo y de la presencia de inmunorreacción específica del B19 los niños no podían eliminar el virus y mostraron un estado de viremia prolongado o persistencia viral en el líquido sinovial.

La infección por parvovirus B19 se ha asociado con diversas formas de vasculitis, colagenosis y puede imitar al lupus eritematoso sistémico (LES) en niños y adultos (39, 45, 46). Similar a la situación en pacientes con artritis también se ha descrito en pacientes con LES infección por parvovirus B19 como agente causante o desencadenante de la enfermedad reumática (47, 48, 49, 50, 51). Recientemente, se describió una asociación entre la infección

persistente por parvovirus B19 y la producción de anticuerpos anti-fosfolipídicos en pacientes pediátricos y adultos con enfermedades reumáticas (52). El síndrome anti fosfolipídico (SAF) (53) se caracteriza, al igual que algunas infecciones por parvovirus B19, por una amplia diversidad de manifestaciones hemocitopénicas y vaso-oclusivas. Adicionalmente la pérdida fetal recurrente y la asociación con anticuerpos dirigidos contra fosfolípidos cargados negativamente y cofactores de proteínas, principalmente  $\beta$ 2-glicoproteína-I son importantes características del SAF. La hipótesis con respecto a una patogenicidad común del síndrome anti-fosfolipídico y las características autoinmunitarias observadas en la infección por B19 no sólo se basa por la estrecha asociación entre la presencia de anticuerpos anti-fosfolipídicos y la infección por parvovirus B19 sino también por la similitud en la presentación de síntomas clínicos en pacientes con infección por parvovirus B19 y en pacientes con el síndrome anti fosfolipídico (SAF).

Girog, A y col. (Girog, A y col. The Journal of General Virology 2002 83(5):973-978) desvelan que la proteína capsidial VP1 del parvovirus del virus adenoasociado de tipo 2 lleva un dominio de fosfolipasa-A2. En el documento WO 03/006067 A, se describen composiciones que comprenden proteínas NS1 y VP1 de parvovirus. Shields, LE y col. (Shields, LE y col. American Journal of Obstetrics & Gynaecology 2000 182(1):S18) describen que la incubación de diversos sistemas de células diferentes con una proteína capsidial B19 de parvovirus da lugar al crecimiento y formación de colonias reducidos de las células incubadas. En el documento WO 00/30668 A, se describe que el parvovirus B19 puede usarse para inhibir el crecimiento o la migración de células que tienen el antígeno P.

La cápside icosaédrica del parvovirus B19 comprende dos proteínas estructurales, VP1 (83kDa) y VP2 (58 kDa), que son idénticas excepto en 227 aminoácidos (aa) en el extremo amino-terminal de la proteína VP1 (la región única de VP1). En la secuencia de aminoácidos de la región única de VP1 está presente un motivo fosfolipasa A2 que abarca las posiciones 130 a 195 (centro activo Fosfolipasa A2) (54). Uno de los mecanismos patogénicos implicado en el desencadenamiento de la producción de anticuerpos anti-fosfolipídicos podría ser la actividad de tipo fosfolipasa-A2 observada en la región única de VP1 de la proteína estructural VP1 del parvovirus B19 (54). Esta actividad enzimática está presente en las partículas infecciosas del B19, en las cápsides vacías recombinantes constituidas por las proteínas VP1/VP2 y en preparaciones de la región única de VP1 purificada. Esto puede contribuir a los procesos inflamatorios inducidos por la producción de leucotrienos y prostaglandinas, pero también puede conducir a la generación de productos de escisión naturales inusuales a partir de compuestos fosfolipídicos celulares que pueden inducir anticuerpos aPL en combinación con un fondo genético distinto.

Hasta ahora no hay disponible ninguna vacuna para prevenir la infección por parvovirus B19. Con respecto a los transcurros graves que se observan en asociación con la infección, los problemas asociados con la infección en gestantes y el potencial viral para inducir una amplia diversidad de respuestas autoinmunitarias en el desarrollo de una vacuna segura que protege contra infecciones por parvovirus B19 se han usado cápsides vacías recombinantes purificadas constituidas por las proteínas VP1/VP2 expresadas por vectores de baculovirus en un ensayo en fase I y se demostró la inducción exitosa de anticuerpos neutralizantes contra B19 en voluntarios (55). Sin embargo, la aplicación de esta vacuna se combinó con una diversidad de efectos secundarios. Además de hinchazón en la zona de aplicación de las inyecciones, en más del 50% de los voluntarios se indicaron síntomas malestar general como fiebre, cefalea y diarrea. Estos efectos secundarios indican que la aplicación de la vacuna produce la manifestación sistémica de los efectos secundarios que se sabe que están asociados con la activación de las reacciones básicas de defensa asociadas con la inflamación. Durante las reacciones inmunes tempranas después de infecciones, por ejemplo, estos efectos se asocian principalmente con la activación de fosfolipasas A2 celulares y citosólicas. Estas enzimas son responsables de la producción de ácido araquidónico como precursor de la producción de prostaglandina y leucotrieno, la inducción de diversas cito- y quimiocinas conduce a fiebre y malestar general. Los efectos secundarios observados por Ballou y colaboradores que usan cápsides vacías de VP1/VP2 producidas por baculovirus recombinantes (55) se debe probablemente a la actividad de tipo fosfolipasa-A2 que es parte de la región única de VP1 de la proteína capsidial viral VP1.

El problema subyacente de la presente invención es proporcionar medicamentos tales como una vacuna contra el parvovirus B19 para la prevención y/o tratamiento de enfermedades asociadas con el parvovirus B19 con mínimos efectos secundarios.

La presente invención aborda este problema proporcionando una composición inmunogénica que comprende un adyuvante y una proteína capsidial VP1 modificada del parvovirus B19 que tiene una sustitución de aminoácido en una o más de histidina 153, tirosina 157, lisina 162 y/o tirosina 168 y tiene una actividad enzimática fosfolipasa A2 reducida en comparación con la proteína capsidial VP1 de tipo silvestre del parvovirus B19 que tiene la secuencia SEC ID NO: 1.

También se desvela una proteína capsidial VP1 del parvovirus B19 que tiene una actividad enzimática de tipo fosfolipasa A2 reducida en comparación con la proteína capsidial VP1 de tipo silvestre del parvovirus B19 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1.

De acuerdo con la presente invención, la actividad fosfolipasa natural se reduce (lo que incluye la completa anulación de la actividad). Por lo tanto, las regiones de la proteína que están implicadas en la reducción de esta actividad fosfolipasa pueden modificarse de acuerdo con la presente invención. Estos cambios comparados con la

secuencia de tipo silvestre pueden introducirse por intercambios, deleciones o inserciones de aminoácidos. Un experto en la materia puede valorar fácilmente la reducción de la actividad fosfolipasa basándose en la metodología desvelada en este documento, especialmente con el ensayo descrito en la Figura 2 de Dorsch y col, 2002 (54). Por otro lado, los cambios no deben modificar significativamente el rendimiento inmunológico de la vacuna (es decir que la mutación no debe influir de manera adversa en las propiedades inmunogénicas).

De acuerdo con la presente invención, los restos aminoacídicos en la región única de VP1 de la proteína capsial VP1 (aminoácidos 100-220, específicamente 130 a 195) están modificados. Esta región está muy conservada en los tres genotipos del parvovirus B19 que hasta ahora se han identificado (60; Fig. 2). Sin embargo aunque obviamente esta región está conservada, pueden observarse diferencias en la actividad de diferentes genotipos de parvovirus B19: Genotipo 1: 100%, Genotipo 2: 70%, Genotipo 3: 59%. La referencia en cuando a la actividad de tipo silvestre significa que para comparar el mutante de tipo silvestre se selecciona el genotipo más próximo (por ejemplo si se fabrica un mutante de genotipo 2, la actividad fosfolipasa del mutante se compara con el tipo silvestre del genotipo 2).

En general, toda la proteína VP1 puede someterse a la introducción de mutaciones para reducir o eliminar la actividad de tipo fosfolipasa A2 de esa proteína. Sin embargo, como las mutaciones fuera de la región única de VP1 (aminoácidos 100-220, específicamente 130 a 195) normalmente tienen, si lo tienen, un potencial de reducción bajo sobre la actividad fosfolipasa, las mutaciones dentro de esta región única de VP1 se prefieren de acuerdo con la presente invención. No obstante, también pueden introducirse mutaciones fuera de la región de la región única de VP1, por ejemplo, por amino-truncamientos o por mutaciones en la región de los aminoácidos 50-90, especialmente 59-81. Si una mutación realiza la reducción esperada de la actividad fosfolipasa puede tratarse fácilmente por la combinación de la expresión del mutante con un ensayo de actividad funcional. Dichos ensayos de actividad fosfolipasa se encuentran bien disponibles en la técnica y también se describen en este documento.

Los sitios de mutación específicamente preferidos están alrededor de los aminoácidos (Tyr(130), Gly(132), Gly(134), Asp(154)) de unión a  $Ca^{2+}$  o alrededor en la red catalítica (His(153), Tyr(157), Tyr(168)), incluyendo la unión fosfolipídica (Lys(162)), es decir aminoácidos 125-140 y 50-175, especialmente 127-137, 152-160 y 165 a 171 (véase también la Sec ID N° 1 y la Figura 2 para las secuencias).

Los intercambios preferidos son los intercambios normalmente usados en las estrategias de mutación para reducir la actividad enzimática, por ejemplo, sustitución de un aminoácido con una cadena lateral funcional (His, Lys, Tyr, Asp, Glu, Ser, Thr, Asn, Gln, etc.) por un aminoácido con una cadena lateral no funcional del mismo o diferente tamaño (Ala, Phe, Leu, Pro, Ile, etc.) o por una cadena lateral funcional diferente (por ejemplo, Asn → Asp, Gln → Ser, etc.). Algunas veces, también es suficiente una ligera diferencia (Val → Ala, Ser → Thr, etc.).

De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, los restos aminoacídicos modificados residen en el centro de la fosfolipasa A2 de la región única de VP-1 de la proteína capsial de VP-1.

De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, se modifican uno o más de los restos aminoacídicos conservados en el centro activo de la fosfolipasa A2. Los restos aminoacídicos en la posición 153: histidina; 157: tirosina; 162: lisina; 168: tirosina; 195: ácido aspártico, se han descrito como partes de la triada catalítica de la fosfolipasa A2 pancreática bovina y se han implicado en la orientación y especificidad del sustrato (58, 59). La modificación de uno o más de los restos de 153: histidina, 157: tirosina, 162: lisina, 168: tirosina produce una reducción incluso más pronunciada de la actividad de tipo fosfolipasa A2, mientras que la modificación y el cambio del resto de 195: ácido aspártico produce una actividad potenciada de tipo fosfolipasa A2.

Por tanto de acuerdo con la presente invención, se modifica uno o más de los restos aminoacídicos en la posición 153: histidina; posición 157: tirosina; posición 162: lisina; y/o posición 168: tirosina.

De acuerdo con otra realización preferida, la histidina 153 se modifica a alanina; la tirosina 157 se modifica a fenilalanina; la lisina 162 se modifica a leucina y/o la tirosina 168 se modifica a fenilalanina.

En general, la mutación de acuerdo con la presente invención debe ser lo menor posible (para no modificar demasiado las propiedades inmunogénicas): normalmente una baja cantidad de sustituciones de aminoácidos (6, 5, 4, 3, 2 o preferentemente 1) y una corta inserción o deleción (30, 20, 10, 5 ó 1 aminoácido) debe ser suficiente para reducir o eliminar eficazmente la actividad fosfolipasa. Sin embargo, siempre que las propiedades inmunogénicas no cambien de manera significativa, no se excluyen inserciones, deleciones más largas (50, 100, 200 aminoácidos) o un mayor número de sustituciones. Sin embargo, las últimas, las mutaciones múltiples también son menos preferidas debido a aspectos económicos.

Si los mutantes tienen propiedades inmunogénicas similares o no puede determinarse fácilmente por ejemplo por reacción con anticuerpos específicos o determinando in vitro o in vivo la capacidad para inducir respuestas inmunes. Generalmente, los mutantes deberían mostrar (con o sin adyuvantes específicos) aproximadamente el 50% de inmunogenicidad in vivo como el tipo silvestre (sin adyuvantes, o preferentemente, con el mismo adyuvante que el mutante), determinado por al menos un procedimiento aplicado y aceptado científicamente (revisión por pares), por ejemplo ensayos ELISpot de unión a anticuerpos, etc. (véase también: el apartado ejemplos de la presente solicitud).

- De acuerdo con la presente invención, la región única de VP1 modificada o la proteína capsidial VP1 modificada de la presente invención produce una actividad enzimática de tipo fosfolipasa A2 reducida en comparación con la proteína capsidial VP1 de tipo silvestre. Preferentemente, la reducción es de al menos el 30% en comparación con el tipo silvestre (es decir el 70% o menos de la actividad de tipo silvestre). Se prefiere adicionalmente una reducción del 50% o menor, 30% o menor, 20% o menor, o 10% o menor de la actividad de tipo silvestre. La actividad de referencia del tipo silvestre y del mutante se determina preferentemente de acuerdo con un ensayo de actividad enzimática de tipo fosfolipasa A2 normalizado, especialmente de acuerdo con la figura 2 de (54).
- Especialmente, estos mutantes que carecen completamente de esta actividad (es decir inferior al 5%, inferior al 1%, o inferior a 0,1%, dependiendo de los límites de detección del procedimiento) son más adecuados para su uso y protección en vacunas de acuerdo con la presente invención.
- Preferentemente, la alternancia de los restos aminoacídicos se realiza por mutagénesis dirigida.
- También se desvela una molécula de ácido nucleico aislado que codifica la proteína capsidial VP1 modificada proporcionada por la presente invención.
- Adicionalmente se desvela un vector de expresión recombinante que comprende las moléculas de ácido nucleico que codifican la región única de VP1 modificada y la proteína capsidial VP1 modificada proporcionada por la presente invención.
- Preferentemente, el vector de expresión recombinante comprende adicionalmente la proteína capsidial VP2 del parvovirus B19 especialmente en el que la proteína puede expresarse junto con la cápside VP1 modificada. Sin embargo, también la expresión combinada de las proteínas VP1 y VP2 que usan dos vectores que se introducen en las células tiene sus ventajas para propósitos específicos.
- Más preferentemente, el vector de expresión recombinante comprende un producto de fusión en el que la región única VP1 modificada o la proteína capsidial VP1 modificada se fusiona con la proteína capsidial VP2.
- Se desvela una célula hospedadora que comprende el vector recombinante de acuerdo con la presente invención.
- Preferentemente, la célula hospedadora es *E. coli*, una levadura o una célula animal.
- Más preferentemente la célula huésped es *Saccharomyces cerevisiae*. Esta especie de levadura se ha usado durante dos décadas para producir partículas recombinantes de HBsAg (antígeno de superficie de la hepatitis B) que protegen contra la infección por el virus de la hepatitis B. Se ha demostrado que el uso de vacunas del VHB derivadas de *S. cerevisiae* recombinante es seguro, observándose efectos secundarios en escasísimas ocasiones.
- Adicionalmente se desvela un procedimiento para la producción de la región única de VP1 modificada o la proteína capsidial VP1 modificada o el producto de fusión de la proteína capsidial VP1 modificada y la proteína capsidial VP2 transformando una célula huésped, expresando la cápside de VP1 (y opcionalmente la cápside de VP2), recuperando la proteína (o proteínas), opcionalmente como partículas similares a virus, usando la célula huésped de acuerdo con la presente divulgación.
- Preferentemente en dicho procedimiento la región única de VP1 modificada y/o la proteína capsidial VP1 modificada y/o el producto de fusión de la proteína capsidial VP1 modificada y la proteína capsidial VP2 se aíslan y/o purifican.
- De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona la región única de VP1 modificada y/o la proteína capsidial VP1 modificada o el producto de fusión de la región única de VP1 modificada y la proteína capsidial VP2 que pueden obtenerse mediante el procedimiento de acuerdo con la divulgación.
- De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona la región única de VP1 modificada y/o la proteína VP1 modificada o el producto de fusión de la región única de VP1 modificada y/o la proteína VP1 modificada y la proteína capsidial VP2 para su uso como medicamentos.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona el uso de la región única de VP1 modificada, la proteína VP1 modificada con o sin proteína capsidial VP2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento contra la infección por parvovirus B19 y/o enfermedades reumáticas y autoinmunes asociadas con el parvovirus B19.
- De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención, se proporciona el uso del producto de fusión de la región única de VP1 modificada, la proteína VP1 modificada y la proteína capsidial VP2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento contra la infección por parvovirus B19 y/o enfermedades reumáticas y autoinmunes asociadas con el parvovirus B19.
- Preferentemente el tratamiento es contra artralgiyas; artritis; más preferentemente monoartritis, oligoartritis, poliartritis, artritis reumatoide y/o artritis idiopática juvenil; lupus eritematoso sistémico (LES); vasculitis, más preferentemente vasculitis leucocitoclástica, púrpura de Henlein-Schoenoch, síndrome papulopurpúrico en guantes y calcetines (SPPGC), enfermedad de Kawasaki, arteritis de células gigantes (ACG), poliartritis nodosa y/o granulomatosis de

Wegener; dermatomiositis; neutropenia autoinmune; trombocitopenia autoinmune; púrpura trombocitopénica idiopática (PTI); anemia hemolítica autoinmune; y/o síndrome hemofagocítico asociado a un virus (SHAV).

5 También se desvela el uso de la región única de VP1 modificada, la proteína capsidial VP1 modificada o el producto de fusión de la región única de VP1 modificada y la proteína capsidial VP2 de acuerdo con la presente invención en un ensayo para detectar anticuerpos dirigidos contra la proteína VP1 del virus B19 en una muestra a ensayar.

Adicionalmente se desvela el uso de las células huésped de la presente invención en un ensayo para detectar anticuerpos dirigidos contra la proteína VP1 del virus B19 en una muestra a ensayar.

También se desvelan las partículas recombinantes similares a un virus constituidas por la proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con la presente invención con o sin proteína capsidial VP2.

10 Adicionalmente se desvelan las partículas recombinantes similares a un virus constituidas por el producto de fusión de la región única de VP1 modificada, la proteína capsidial VP1 modificada y la proteína capsidial VP2 de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, pueden usarse las partículas recombinantes similares a un virus para la fabricación de un medicamento para el tratamiento contra la infección por parvovirus B19 y/o enfermedades autoinmunes y reumáticas asociadas con parvovirus B19.

15 Preferentemente el tratamiento es contra artralgias; artritis; más preferentemente monoartritis, oligoartritis, poliartritis, artritis reumatoide y/o artritis idiopática juvenil; lupus eritematoso sistémico (LES); vasculitis, más preferentemente vasculitis leucocitoclástica, púrpura de Henlein-Schoenoch, síndrome papulopurpúrico en guantes y calcetines (SPPGC), enfermedad de Kawasaki, arteritis de células gigantes (ACG), poliarteritis nodosa y/o granulomatosis de Wegener; dermatomiositis; neutropenia autoinmune; trombocitopenia autoinmune; púrpura trombocitopénica idiopática (PTI); anemia hemolítica autoinmune; y/o síndrome hemofagocítico asociado a un virus (SHAV).

También se desvela el uso de partículas recombinantes similares a un virus de acuerdo con la presente invención en un ensayo para detectar anticuerpos dirigidos contra la proteína VP1 del virus B19 en una muestra a ensayar.

25 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica, especialmente una preparación de vacuna para inducir una respuesta inmunitaria que proporciona protección contra el parvovirus humano B19, que comprende la región única de VP1 modificada, la proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con la presente invención con o sin la proteína capsidial VP2.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica, especialmente una preparación de vacuna para inducir una respuesta inmunitaria que proporciona protección contra el parvovirus humano B19 que comprende el producto de fusión de la proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con la presente invención.

30 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica, especialmente una preparación de vacuna para inducir una respuesta inmunitaria que proporciona protección contra el parvovirus humano B19, que comprende las partículas recombinantes similares a un virus de acuerdo con la presente invención.

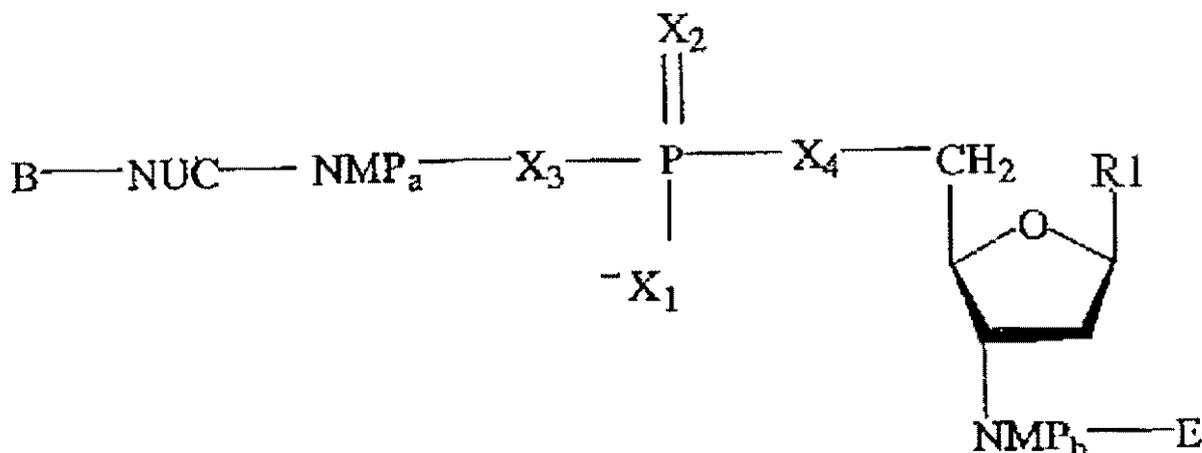
Preferentemente, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden adicionalmente uno o más transportadores y/o adyuvantes adecuados para los propósitos de la vacunación.

40 Por lo tanto, las composiciones proporcionadas por la presente invención, especialmente en forma de una vacuna, pueden comprender adicionalmente una sustancia autoinmunoestimuladora, preferentemente seleccionada del grupo constituido por un compuesto policatiónico, preferentemente un polímero policatiónico, más preferentemente un péptido policatiónico, especialmente poliarginina, polilisina o un péptido antimicrobiano, polímeros; desoxinucleótidos inmuoestimuladores (ODN); péptidos que contienen al menos dos motivos LysLeuLys; compuestos neuroactivos especialmente la hormona de crecimiento humana; alumbre, adyuvante completo o incompleto de Freund o combinaciones de los mismos.

45 La presente vacuna comprende preferentemente

- como antígeno, una proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con la presente invención
- un péptido que comprende una secuencia  $R_1$ -XZX<sub>N</sub>XZX-R<sub>2</sub>, en la que N es un número entero entre 3 y 7, preferentemente 5, X es un resto aminoacídico natural y no natural cargado positivamente, Z es un resto aminoacídico seleccionado del grupo constituido por L, V, I, F y/o W, y R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se seleccionan independientemente entre sí del grupo constituido por -H, -NH<sub>2</sub>, -COCH<sub>3</sub>, -COH, un péptido con hasta 20 restos aminoacídicos o un grupo peptídico reactivo o un engarce peptídico con o sin un péptido; X-R<sub>2</sub> puede ser una amida, éster o tioéster del resto aminoacídico C-terminal del péptido (en lo sucesivo denominado también "Péptido A") y/o
- una molécula de ácido oligodesoxinucleico (ODN) inmuoestimulador que tiene la estructura de acuerdo con la

fórmula (I)



en la que

- 5 R1 se selecciona de hipoxantina y uracilo, cualquier X es O o S, cualquier NMP es un 2' desoxinucleósido monofosfato o monotiofosfato, seleccionado del grupo constituido por desoxiadenosina, desoxiguanosina-, desoxiinosina-, desoxicitosina-, desoxiuridina-, desoxitimidina-, 2-metil-
- 10 desoxiinosina-, 5-metil-desoxicitosina-, desoxipseudouridina-, desoxirribosapurina-, 2-amino-desoxirribosapurina-, 6-S-desoxiguanina-, 2-dimetil-desoxiguanosina- o N-isopentenil-desoxiadenosina-monofosfato o -monotiofosfato, NUC es un 2' desoxinucleósido, seleccionado del grupo constituido por desoxiadenosina-, desoxiguanosina-, desoxiinosina-, desoxicitosina-, desoxiinosina-, desoxitimidina-, 2-metil-desoxiuridina-, 5-metil-
- 15 desoxicitosina-, desoxipseudouridina-, desoxirribosapurina-, 2-amino-desoxirribosapurina-, 6-S-desoxiguanina-, 2-dimetil-desoxiguanosina- o N-isopentenil-desoxiadenosina, a y b son números enteros de 0 a 100 con la condición de que a + b esté entre 4 y 150 y B y E son grupos comunes para terminaciones 5' ó 3' de moléculas de ácido nucleico (en lo sucesivo denominados también "I-U-ODN").

Por supuesto, la presente vacuna puede contener adicionalmente otras sustancias, por ejemplo diluyentes o transportadores farmacéuticamente aceptables, sustancias tamponantes o estabilizantes, etc.

- 20 La vacuna de acuerdo con la presente invención también puede contener otros adyuvantes o adicionales, específicamente un adyuvante  $Al(OH)_3$  (alumbre).

Como se entiende en este documento, el alumbre incluye todas las formas de adyuvantes basados en  $Al^{3+}$  usados en medicina e investigación humana y animal. Especialmente, incluye todas las formas de hidróxido de aluminio como se define en Römpf, 10ª Ed. páginas 139/140, formas en gel de los mismos, fosfato de aluminio, etc.

- 25 Los péptidos o compuestos policatiónicos a usar de acuerdo con la presente invención pueden ser cualquier compuesto policatiónico que muestre el efecto característico de acuerdo con el documento WO 97/30721. Los compuestos policatiónicos preferidos se seleccionan de los polipéptidos básicos, policationes orgánicos, poliaminoácidos básicos o mezclas de los mismos. Estos poliaminoácidos deberían tener una longitud de cadena de al menos 4 restos aminoácidos. Especialmente preferidas son las sustancias que contienen enlaces peptídicos,
- 30 como polilisina, poliarginina y polipéptidos que contienen más del 20%, especialmente más del 50% de aminoácidos básicos en el intervalo de más de 8, especialmente más de 20, restos aminoácidos o mezclas de los mismos. Otros policationes preferidos y sus composiciones farmacéuticas se describen en el documento WO 97/30721 (por ejemplo, polietileneimina) y en el documento WO 99/38528. Preferentemente estos polipéptidos contienen entre 20 y 500 restos aminoácidos, especialmente entre 30 y 200 restos.
- 35 Estos compuestos policatiónicos pueden producirse químicamente o de manera recombinante o pueden proceder de fuentes naturales.

Los (poli)péptidos cationicos también pueden ser péptidos microbianos antibacterianos policatiónicos. Estos (poli)péptidos pueden ser de origen procarionta o eucarionta o pueden producirse químicamente o de manera recombinante. Los péptidos también pueden pertenecer a la clase de péptidos antimicrobianos de origen natural.

40 Dichos péptidos de defensa a huésped o defensivos también son una forma preferida del polímero policatiónico de acuerdo con la presente invención. Generalmente, como polímero policatiónico se usa un compuesto que permitido

como una activación del producto final (o regulación negativa) del sistema inmune adaptativo, preferentemente mediado por las células presentadoras de antígeno CPA (incluyendo las células dendríticas).

Adicionalmente, los compuestos neuroactivos, tales como la hormona de crecimiento (humana) (como se describe por ejemplo en el documento WO 0124822), pueden usarse como inmunoestimulantes (Inmunizadores).

5 Los compuestos policatiónicos derivados de fuentes naturales incluyen VIH-REV o VIH-TAT (péptidos catiónicos derivados, péptidos antenapedia, quitosán u otros derivados de quitina) u otros péptidos derivados de estos péptidos o proteínas por producción bioquímica o recombinante. Otros compuestos policatiónicos preferidos son la catelicidina o sustancias relacionadas o derivadas de la catelicidina, especialmente catelicidinas de ratón, bovinas o especialmente humanas y/o catelicidinas. Las sustancias de catelicidinas relacionadas o derivadas contienen toda o partes de la secuencia de catelicidina con al menos 15-20 restos aminoácídicos. Las derivaciones pueden incluir la sustitución o modificación de los aminoácidos naturales por aminoácidos que no se encuentran entre los 20 aminoácidos convencionales. Por otra parte, pueden introducirse otros restos catiónicos en dichas moléculas de catelicidina. Estas moléculas de catelicidina son las preferidas para combinar con la composición antígeno/vacuna de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, de manera sorprendente estas moléculas de catelicidina han resultado ser también eficaces como un adyuvante para un antígeno sin la adición de adyuvantes adicionales. Por lo tanto es posible usar dichas moléculas de catelicidina como adyuvantes eficaces en las formulaciones de vacunas con o sin sustancias inmunoactivantes adicionales.

La vacuna de acuerdo con la presente invención contiene preferentemente como Péptido A KLKL<sub>5</sub>KLK y/o como I-/U-ODN oligo d(IC)<sub>13</sub>. (La combinación del Péptido A y del Oligo-d(IC)<sub>13</sub> también se denomina IC31). Estas dos sustancias son específicamente ventajosas de acuerdo con la presente invención.

La vacuna de acuerdo con la presente invención puede contener un oligodesoxinucleótido que contiene un motivo CpG como ácido nucleico inmunomodulador. Los ácidos nucleicos inmunomoduladores para usar de acuerdo con la presente invención pueden ser de origen sintético, procariota y eucariota. En el caso de origen eucariota, el ADN debe proceder de, basándose en el árbol filogenético, especies menos desarrolladas (por ejemplo insectos, pero también otras). En una realización preferida de la invención el oligodesoxinucleótido inmunogénico (ODN) es una molécula de ADN producida sintéticamente o mezclas de dichas moléculas. También se incluyen los derivados o modificaciones de los ODN tales como análogos tiofosfato sustituidos (restos tiofosfato sustituidos por fosfato) como por ejemplo se describe en las patentes de Estados Unidos US 5.723.335 y US 5.663.153 y otros derivados y modificaciones, que estabilizan preferentemente la composición (o composiciones) inmunoestimuladora pero no cambian sus propiedades inmunológicas. Un motivo de secuencia preferido es un motivo de ADN de seis bases que contiene un dinucleótido CpG (no metilado) flanqueado por dos purinas en 5' y dos pirimidinas en 3' (5'-Pur-Pur-C-G-Pyr-Pyr-3'). Los motivos CpG contenidos en los ODN de acuerdo con la presente invención son más comunes en el ADN microbiano que en el de vertebrados superiores y presentan diferencias en el patrón de metilación. Sorprendentemente, las secuencias que estimulan las CPA (células presentadoras de antígeno) de ratón no son muy eficaces para las células humanas. Los ODN palindrómicos o no palindrómicos preferidos para usar de acuerdo con la presente invención se describen por ejemplo en las solicitudes de Patente Australianas A 1973/2000, A 805/2001, EP 0 468 520 A2, WO 96/02555, WO 98/16247, WO 98/18810, WO 98/37919, WO 98/40100, WO 98/52581, WO 98/52962, WO 99/51259 y WO 99/56755 todas ellas incorporadas en este documento por referencia. Los ADN/ODN pueden producirse químicamente o de manera recombinante o pueden proceder de fuentes naturales. Las fuentes naturales preferidas son los insectos.

La vacuna de acuerdo con la presente invención puede contener preferentemente un péptido policatiónico y un oligodesoxinucleótido que contiene un motivo CpG en combinación. La combinación de CpG-ODN y péptido policatiónico tiene efectos de mejora en las composiciones de vacuna, que son comparables a los efectos de la combinación del Péptido A y los I-/U-ODN y no solo pueden combinarse con el Péptido A y los I-/U-ODN sino que incluso pueden usarse en lugar de estos. Por supuesto, pueden usarse todas las mezclas de ácidos nucleicos inmunoestimuladores diferentes (I-/U-ODN, CpG-ODN,...) y variantes del Péptido A (así como otros Inmunizadores) de acuerdo con la presente invención.

Previamente se ha demostrado (documento WO 02/13857) que los péptidos antimicrobianos derivados de la catelicidina, de origen natural o derivados de los mismos tienen una respuesta inmunitaria que estimula la actividad y por lo tanto constituyen adyuvantes de inducción de tipo 1 muy eficaces (Inmunizadores). Las principales fuentes de péptidos antimicrobianos son gránulos de neutrófilos y células epiteliales que revisten los tractos respiratorio, gastrointestinal y genitourinario. En general estos se encuentran en los sitios anatómicos más expuestos a la invasión microbiana, se secretan en los fluidos corporales internos o se almacenan en los gránulos citoplásmicos de los fagocitos profesionales (neutrófilos).

55 En el documento WO 02/32451 se describe un adyuvante de inducción de tipo 1 (Inmunizador) que puede potenciar fuertemente la respuesta inmunitaria contra un antígeno específico co-administrado y por lo tanto constituye un adyuvante muy eficaz, el Péptido A que comprende una secuencia R<sub>1</sub>-XZX<sub>n</sub>XZX-R<sub>2</sub>. Un péptido específicamente preferido es KLKLLLLLKLK. Además de péptidos antimicrobianos de origen natural, se han producido e investigado péptidos sintéticos antimicrobianos. El péptido sintético antimicrobiano KLKLLLLLKLK-NH<sub>2</sub> demostró tener actividad quimioterapéutica significativa en ratones infectados con *Staphylococcus aureus*; los neutrófilos humanos se

activaron para producir el anión superóxido ( $O_2^-$ ) mediante la calreticulina de la superficie celular. Se observó que el número y la posición de K y L exactos eran críticos para la actividad antimicrobiana del péptido sintético.

5 La presente invención es especialmente beneficiosa si la vacuna se administra por vía subcutánea, intramuscular, intradérmica o transdérmica. Sin embargo, para la presente invención también son adecuadas otras formas de aplicación, tales como parenteral, intravenosa, intranasal, oral o aplicación tópica.

El antígeno contra el parvovirus de acuerdo con la presente invención puede mezclarse con un adyuvante (Inmunizador) (composición) o formularse específicamente de otra manera por ejemplo como liposoma, formulación retardada, etc.

10 Las vacunas de acuerdo con la presente invención pueden administrarse a un individuo en cantidades eficaces conocidas por los expertos en la materia. La optimización de la cantidad de antígeno y la cantidad de inmunizador puede comenzar a partir de cantidades establecidas y usando procedimientos disponibles.

También se desvela un kit de diagnóstico que comprende una región única de VP1 modificada, una proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con la presente invención y reactivos auxiliares.

15 También se desvela un kit de diagnóstico que comprende un producto de fusión de la proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con la presente invención y reactivos auxiliares.

Adicionalmente se desvela un kit de diagnóstico que comprende partículas recombinantes similares a un virus de acuerdo con la presente invención y reactivos auxiliares.

20 Adicionalmente se desvela el uso de la región única de VP1 modificada, la proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con la presente invención con o sin proteína capsidial VP2 como un agente para modificar la actividad de una actividad de la fosfolipasa A2 huésped, por ejemplo por terapia génica o usando ARN o ARNi antisentido.

También se desvela el uso del producto de fusión de la proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con la presente invención como un agente para modificar la actividad de una actividad de la fosfolipasa A2 huésped.

Adicionalmente se desvela el uso de las partículas recombinantes similares a un virus de acuerdo con la presente invención como un agente para modificar la actividad de una actividad de la fosfolipasa A2 huésped.

25 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y figuras, de los que pueden extraerse características, realizaciones y ventajas adicionales. Debe entenderse que los presentes ejemplos solo se proporcionan a modo de ilustración y no a modo de limitación de la divulgación.

La Figura 1 muestra una comparación inmunológica de una proteína ts (de tipo silvestre) y mutante

La Figura 2 muestra un alineamiento de la proteína VP1 del parvovirus.

### 30 Ejemplo 1

La producción de antígenos contra VP1/VP2 sin actividad enzimática puede conseguirse por modificación de los restos que son parte del centro activo por mutagénesis dirigida. A pesar del hecho de que el tamaño global de las enzimas celulares con actividad fosfolipasa A2 dependiente de  $Ca^{2+}$  y la región única de VP1 viral es diferente, los alineamientos que comparan las secuencias de aminoácidos revelan diversos restos conservados en la región que representan el centro activo de la enzima. Se observaron aminoácidos conservados en las siguientes posiciones:

40 Resto 153: histidina; resto 157: tirosina; resto 162: lisina; resto 168: tirosina; resto 195: ácido aspártico. Los aminoácidos respectivos se han descrito como partes de la triada catalítica de la fosfolipasa A2 pancreática bovina y se han implicado en la orientación y especificidad del sustrato. Por lo tanto, la modificación de estos restos en la región única de VP1 por mutagénesis dirigida se realizó usando la reacción en cadena de la polimerasa con un cebador mutado y una extensión solapada como se ha descrito inicialmente por Ho y colaboradores (56). Como se muestran en la tabla 2 la actividad de tipo fosfolipasa A2 de la región única de VP1 podría reducirse intercambiando ambas tirosinas 157 y 168 por fenilalanina y modificando la lisina 162 por leucina. Sin embargo el intercambio del ácido aspártico 195 por alanina conduce a una potenciación inesperada de la actividad de la enzima viral indicando distintas diferencias entre las enzimas fosfolipasa A2 viral y celular. Podría conseguirse una destrucción casi total de la actividad enzimática solamente modificando la histidina 153 por alanina. Se puede llegar a la conclusión de que este resto aminoacídico es parte del centro activo y es más importante para la actividad enzimática de la región única de VP1. Su modificación está asociada con la destrucción completa de la actividad viral de tipo fosfolipasa A2.

Tabla 1: Enfermedades autoinmunes que se describen en asociación con la infección por el parvovirus B19

Órganos implicados	Enfermedades
Articulaciones	Artralgias Artritis Monoartritis Oligoartritis Poliartritis Artritis reumatoide Artritis idiopática juvenil
Tejido conectivo/vasos	Lupus eritematoso sistémico (LES) Vasculitis Vasculitis leucocitoclástica Púrpura de Henlein-Schoenoch Síndrome papulopurpúrico en guantes y calcetines (SPPGC) ¿Enfermedad de Kawasaki? Arteritis de células Gigantes (ACG) Poliarteritis nodosa Granulomatosis de Wegener Dermatomiositis
Células sanguíneas	Neutropenia autoinmune Trombocitopenia autoinmune Púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) Anemia hemolítica autoinmune Síndrome hemofagocítico asociado a virus (SHAV)

Tabla 2: Actividad enzimática de tipo fosfolipasa A2 en la región única de VP1 del parvovirus B19 y variantes construidas por mutagénesis dirigida

Posición modificada por mutagénesis dirigida del tipo silvestre, genotipo 1	Actividad enzimática (%)
	100

**mutantes del centro activo**

histidina 153 → alanina	0
tirosina 157 → fenilalanina	10
lisina 162 → leucina	61
tirosina 168 → fenilalanina	54
ácido aspártico 195 → alanina	204

**mutantes del centro no activo**

leucina 76 → glutamina,	fenilalanina 81 → alanina 80
isoleucina 66 → leucina,	leucina 70 → glutamina 144
leucina 59 → glutamina,	leucina 62 → glutamina 143

5

**variaciones en regiones no conservadas**

parvovirus B19, genotipo 2 /cepa Berlin 70, región única de VP1

ala18 → asp, gln21→lys, asn68 →ser, asn72 → asp, ser73 → thr,  
ser96 → pro, ala101 → thr, val123 →ile, val192 → ala

10 parvovirus B19, genotipo 3 /cepa V9 59 , región única de VP1

lys4 → thr, ser5 → thr, gly6 → asn, aspl2 → ser, lys17 → gln,  
ala18 → asp, gln21 → lys, glu25 → gln, val30 → ala, asn68 → ser,  
ser98 → asn, his100 → ser, val123 → ile, ser144 → asn, val192 → ala

## Ejemplo 2

Estudio de Comparación para la Inmunogenicidad entre proteínas VP1 de tipo silvestre y mutante.

**Inoculación de ratones.** Se inocularon grupos de 5 ratones hembra Balb/C con 50 µg de preparaciones purificadas de la *región única de VP1/de tipo silvestre* y la *región única de VP1/H153A* en emulsión con adyuvantes de Freund completos. Se extrajeron muestras sanguíneas retrobulbares los días 0, 3, 7, 10, 14, 18 y 28 después de la inoculación. Los sueros se ensayaron para determinar la presencia de anticuerpos IgG contra la *región única de VP1/de tipo silvestre* en ensayos ELISA.

**Producción de proteínas.** Se clonaron las secuencias que codifican la *región única de VP1/de tipo silvestre* y la *región única de VP1/H153A* en el vector de expresión T7 pET21a<sub>int</sub> en fusión con una interna y un dominio de unión a quitina como se ha descrito anteriormente (Dorsch y col., 2001, Dorsch y col., 2002). Las construcciones se introdujeron en la cepa de *E. coli* BL21. Las bacterias se inocularon con medio CL (caldo de Luria) que contenía 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron a 37°C. Se indujo la expresión de la proteína recombinante añadiendo IPTG 1 mM durante al menos 3 h de cultivo. Las bacterias se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en 30 ml de HEPES 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, pH a 8,5 y se lisaron usando una Prensa de French. El residuo se sedimentó a 10000 g. El sobrenadante se cargó en una columna de quitina (NEB) usando el sistema FPLC, (cromatografía líquida de proteína rápida) (Pharmacia Biosystems, Freiburg). La columna se lavó con 2 volúmenes de HEPES 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, pH 8,5, 8 volúmenes de HEPES 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 2 mM, pH 8,5 y 2 volúmenes de HEPES 20 mM, EDTA 1 mM NaCl 100 mM, pH 8,5. Después de esto la proteína se eluyó usando 3 volúmenes de DTT 50 mM en tampón HEPES 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, pH 8,5. Las fracciones se ensayaron para determinar las proteínas recombinantes mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida - Dodecil sulfato sódico) y tinción con plata. Las fracciones positivas se unificaron y se concentraron usando un concentrador Centriplus (volumen de exclusión 3kD; Amicon, Beverly, USA). La concentración de la proteína se determinó después de diálisis frente a PBS (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,9 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>2</sub> 0,8 mM X12H<sub>2</sub>O; KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM) usando un ensayo Bradford (Bio Rad Laboratories, Hercules, USA).

**Ensayo ELISA.** Se recubrieron placas de microtitulación (Maxisorb, Nunc, Wiesbaden, FRG) durante una noche con proteína purificada (*región única de VP1/de tipo silvestre*, 10 ng/pocillo) en tampón NaCO<sub>3</sub> 0,2 M, pH 9,2 que contenía NaCl 0,15 M. Los sueros se usaron en diluciones de 1:100 en PBS/Tween-20 al 0,5% y se detectaron anticuerpos IgG usando IgG de conejo anti-ratón policlonal acoplado a HRP como anticuerpos secundarios (dilución 1:5000 en PBS/Tween-20 al 0,5%, da Dako, Hamburg FRG) y TMB como sustrato, la densidad óptica se determinó a 450 nm.

## Resultados

Comenzando desde el día 7 después de la inoculación los anticuerpos IgG dirigidos contra la *región única de VP1/de tipo silvestre* eran detectables en ratones que se habían inoculado con las dos preparaciones purificadas de la *región única de VP1/de tipo silvestre* y la *región única de VP1/H153A* (Figura 1). Las cantidades de anticuerpos aumentaron de manera continua hasta el día 28 después de la inoculación. No pudieron observarse diferencias en la reactividad de los ratones inoculados con la *región única de VP1/de tipo silvestre* o la *región única de VP1/H153A*. Estos resultados indican que las dos proteínas son muy antigénicas. Los anticuerpos inducidos contra la variante de la *región única de VP1/H153A* tienen la capacidad de unirse a la *región única de VP1/de tipo silvestre* que se había usado como antígeno en el ELISA indicando un elevado grado de reactividad cruzada. Los ratones que se inocularon con PBS en emulsión con adyuvantes completos de Freund no desarrollaron ninguna cantidad significativa de anticuerpos específicos contra VP1.

Se inoculó en ratones el antígeno de la *región única de VP1/de tipo silvestre* y el antígeno mutante (His153Ala). La producción de anticuerpos específicos contra VP1 se analizó mediante ELISA. No se observaron diferencias en cuanto a la capacidad de los dos antígenos para provocar la producción de anticuerpos específicos contra VP1. Los anticuerpos contra el antígeno mutante His153Ala eran similarmente activos para unirse a la *región única de VP1 de tipo silvestre* y viceversa. Esto indica que la variante mutante His153Ala de la *región única de VP1 del parvovirus B19* tiene una capacidad comparable para provocar la producción de anticuerpos a la del dominio de la proteína de tipo silvestre. Puesto que se sabe que los principales epítopes neutralizantes se localizan en diferentes partes de la proteína del centro activo de la enzima de tipo fosfolipasa A2 viral y cuando no se ven afectados por ninguna de las mutaciones introducidas, los efectos sobre la inmunogenicidad de las proteínas son poco probables (57).

La combinación de las dos estrategias – la producción de cápsidas de VP1/VP2 en *S. cerevisiae* recombinante y la destrucción de la actividad de tipo fosfolipasa A2- tiene el potencial para producir una vacuna que permita la prevención de la infección por el parvovirus B19 sin un número de efectos secundarios reducidos debido a la producción elevada de leucotrieno y prostaglandina y sin potencial peligroso para inducir reacciones autoinmunes que pueden derivar en enfermedades reumáticas de larga duración.

## Leyenda

Figura 1. El desarrollo de anticuerpos IgG contra la *región única de VP1/de tipo silvestre*. Se inocularon grupos de 5 ratones con la *región única de VP1/de tipo silvestre*, la *región única de VP1/H153A* o PBS. Las muestras de suero

extraídas los días que se indican después de la inoculación se ensayaron en ELISA usando como antígeno la *región única de VP1*. En cada caso se determinaron los valores promedio obtenidos del ensayo de muestras individuales de 5 ratones.

Referencias

- 5 1. Cossart Y.E., Cant B., Field A.M., Widdows D. 1975, *Lancet* 1, 72.
2. Paver W.K., Clarke S.K.R. 1976, *J. Clin. Microbiol.* 4, 67.
3. Shneerson J.M., Mortimer P.A.G.S., Vandervelde E.M. 1980, *Br. Med. J.*, 280, 1580.
4. Anderson M., Lewis E., Kidd I.M., Hall S.M., Cohen B.J. 1984, *J. Hyg. (Londres)* 93, 85.
- 10 5. Chorba T., Coccia P., Holman R.C., Tattersall P., Anderson L.J., Sudman J., Young, N.S., Kurczynski E., Saارين U.M., Moir R. 1986, *J. Infect. Dis.* 154, 383.
6. Blümel J., Schmidt I., Effenberger W., Seitz H., Willkommen H., Brackmann H.H., Lo J., Eis-Hübinger A.M. 2002, *Transfusion*, 42, 1473.
7. Hayakawa F., Imada K., Towatari M., Saito H. 2002, *Br. J. Haematol.*, 118, 1187.
8. Prowse C, Ludlam C.A., Yap P.L. 1997, *Vox Sanguinis*, 72, 1.
- 15 9. Yaegashi N., Niinuma T., Chisaka H., Watanabe T., Uehara S., Okamura K., Moffat S., Sugamura K., Yajima A. 1998, 37, 28.
10. Ozawa K., Young N. 1987, *J. Virol.*, 62, 2508.
11. Brown K.E., Anderson S.M., Young N.S. 1993, *Science*, 262, 114.
12. Bültmann B.D., Klingel K., Sotlar K., Bock, C.F., Kandolf R. 2003, *Virchows Arch.* 442, 8.
- 20 13. Cassinotti P., Siegl G., Michel B.A., Bruhlmann P. 1998 *J. Med. Virol.*, 56, 199.
14. Eis-Hübinger A.M., Reber U., Abdul-Nour T., Glatzel U., Lauschke H., Putz U. 2001, *J. Med. Virol.*, 65, 395.
15. Hokynar K., Brunstein J., Söderlund-Venermo M., Kiviluoto O., Partio E.K., Konttinen Y., Hedman K. 2000, *J. Gen. Virol.*, 81, 1017.
16. Söderlund M., von Essen R., Haapasaari J., Kiistala U., Kiviluoto O., Hedman K. 1997, *Lancet* 349, 1063.
- 25 17. Vuorinen T., Lammintausta K., Kotilainen P., Nikkari S. 2002 *J. Clin. Virol.*, 25, 217.
18. Cherry J.D. 1994, *Adv. Pediatr.*, 46, 245.
19. Török T.J. 1997, Anderson LJ, Young NS (Ed). *Human parvovirus B19. Monogr Virol, Vol. 20. Basel: Karger; 61.*
20. Heegard E.D., Brown K.E. 2002, *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 485.
- 30 21. Langnas A.N., Markin R.S., Catral M.S., Naides S.J. 1995, *Hepatology* 22, 1661
22. Bousvaros A., Sundel R., Thorne G.M., McIntosh K., Cohen M., Erdman D.D., Perez-Atayde A., Finkel T.H., Colin A.A. 1998, *Pediatr. Pulmonol.* 26, 365.
23. Wardeh A., Marik P. 1998, *J. Internal Med.*, 244, 257.
24. Yoto Y., Kudoh T., Haseyama K., Tsutsumi H. 2001, *Lancet*, 358, 2168.
- 35 25. Rogers B.B., Singer, D.B., Mak S.K., Gary G.W., Fikrig M.K., McMillan P.M. 1993, *Obstet. Gynecol.* 81, 402.
26. Nyman M., Tolfvenstam T., Petersson K., Krassny C., Skjolde-brand-Sparre L., Broliden K. 2002, *Obstet. Gyne-col.* 99, 795.
27. Miller E., Fairley C.K., Cohen, B.J., Seng C. 1998, *B.J.Obstet.Gynaecol.*105, 174.
- 40 28. Knöll A., Louwen F., Kochanowski B., Plentz A., Stüssel J., Beckenlehner K., Jilg W., Modrow S. 2002, *J. Med. Virol.* 67, 259.
29. Kurtzman G.J., Ozawa K., Cohen B., Hanson G., Oseas R., Blase R.M., Young N.S. 1987, *N. Engl. J. Med.* 317, 287.
30. Pont J., Puchhammer-Stöckl E., Chott A., Popow-Kraupágs T., Kienzer I., Postner G., Honetz N. 1992, *Br. J. Haematol.* 80, 160.
- 45 31. Scheurlen W., Ramasubbu K., Wachowski O., Hemauer A., Modrow S. 2001, *J. Clin. Virol.*, 20, 173.
32. Hanada T., Koike K., Hirano C., Takeya T., Suzuki T., Matsunaga Y., Takita H. 1989, *Eur. J. Haematol.*, 42, 77.
33. Lefrere J.J., Courouce A.M., Kaplan C. 1989 *Lancet*, 1, 279.
34. Murray J.C., Kelley P.K., Hogrefe W.R., McClain K.L. 1994, *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 16, 314.
- 50 35. Hida M., Shimamura J., Ueno E., Watanabe 2000, *J. Pediatr. Int.*, 42, 708.
36. Naides S.J., Scharosch L.L. Foto F., Howard E.J. 1990, *Arthritis. Rheum.* 33, 1297.
37. Murai C., Munakata Y., Takahashi Y.; Ishii T., Shibata S., Muryoi T., Funato T., Nakamura M., Sugamua K., Sasaki F.T. 1999, *Ann. Rheum. Dis* 58, 130.
38. Nikkari S., Luukkainen R., Möttönen T., Meurman O., Hannonen P., Skurnik M., Toivanen P. 1994, *Ann. Rheum. Dis.* 53, 106.
- 55 39. Moore T.L. 2000, *Curr. Opin. Rheumatol.* 12, 289.
40. Lehmann H.W., Kühner L., Beckenlehner K., Müller-Godeffroy E., Heide K.G., Küster R.M., Modrow S. 2002, *J. Clin. Virol.*, 25, 135.
41. Nocton J.J., Miller L.C., Tucker L.B., Schaller J.G.. 1993, *J. Pediatr.*, 122, 186.
- 60 42. Mimori A., Misaki Y., Hachiya T., Ito K., Kano S. 1994, *Rheum. Int.*, 14, 87.
43. Oguz F., Akdeniz C., Unuvar E., Kucukbasmaci O., Sidal M. 2002, *J. Paediatr. Child Health* 38, 358.
44. Lehmann H.W., Knoll A., Küster R.M., Modrow S. 2003, *Arthritis Rheum.* 48, 1631.
45. Negro A., Regolisti G., Perazzoli F., Coghi P., Tumiatei B., Rossi E. 2001, *Ann. Ital. Med. Int.*, 16, 125.
46. Tovari E., Mezey I., Hedman K., Czirkak L. 2002, *Ann. Rheum. Dis.*, 61, 662.

47. Cope A.P., Jones A., Brozovic M., Shafi M.S., Maini R.N. 1992, *Ann. Rheum. Dis.*, 51, 803.  
 48. Trapani S., Ermini M., Falcini F. 1999, *Semin. Arthr. Rheum.* 28, 319.  
 49. Hemauer A., Beckenlehner K., Wolf H., Lang B., Modrow S. 1999, *J. Clin. Virol.*, 14, 73.  
 50. Hsu T.-C., Tsay G.J. 2001, *Rheumatol.*, 40, 152.  
 51. Diaz F., Collazos J., Mendoza F., de la Viuda J.M., Cazallas J., Urkijo J.C., Flores M. 2002, *Clin Microbiol Infect.*, 8, 115.  
 52. Landenberg v. P., Lehmann H.W., Knöll A., Dorsch S., Modrow S. 2003, *Arthritis Rheum.* 48, in press.  
 53. Cervera R., Piette J.C., Font J., Khamashta M.A., Shoenfeld Y., Camps M.T., Jacobsen S., Lakos G., Tincani A., Kontopoulou-Griva I., Galeazzi M., Meroni P.L., Derksen R.H., de Groot P.G., Grommnic-Ihle E., Baleva M., Mosca M., Bombardieri dez-Nebro A., Boffa M.C., Hughes G.R., Ingelmo M. 2002, *Arthritis Rheum.*, 46, 1019.  
 54. Dorsch S., Liebisch G., Kaufmann B., von Landenberg P., Hoffmann J.H., Drobnik W., Modrow S. 2002, *J. Virol.* 76, 2014.  
 55. Ballou W.R., Reed, J.L., Noble, W., Young N.S. 2003, *J. Infect. Diseases*, 187, 675.  
 56. Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K., Pease L.R. 1989, *Gene* 77, 51.  
 57. Gigler A., Dorsch S., Hemauer A., Williams C., Young N.S., Zolla-Pazner S., Gorny M.K., Modrow S. 1999, *J. Virol.*, 73, 1974.  
 58. Arni R.K., and R. J. Ward. 1996. Phospholipase A2 - a structural review. *Toxicon* 34: 827-841.  
 59. Moore, T. L., R. Bandlamudi, S. M. Alam, and G. Neshier. 1999. Parvovirus infection mimicking systemic lupus erythematosus in a pediatric population. *Semin. Arthritis Rheum.* 28: 314-318.  
 60. Servant A, Laperche S, Lallemand F, Marinho V, De Saint Maur G, Meritet JF, Garbarg-Chenon A. Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. *J Virol.* 2002 76:9124-34.  
 61. Liefeldt, L., Plentz, A., Klempa, B., Kershaw, O., Endres, A.S., Raab, U., Neumayer, H.H., Meisel, Hans G. Faßbender, H., Modrow, S. Recurrent high level parvovirus B19/genotype 2 viremia in a renal transplant recipient analyzed by real-time PCR for simultaneous detection of genotypes 1 to 3. *J. Med. Virol.*, en prensa.  
 62. Dorsch, S., Kaufmann, B., Schaible, U., Prohaska, E., Wolf, H., Modrow, S. (2001) The VP1-unique region of parvovirus B19: Amino acid variability and antigenic stability. *J. Gen. Virol.*, 82, 191-199.  
 63. Dorsch, S., Liebisch, G., Kaufmann, B., Hoffmann, J.H., v. Landenberg, P., Drobnik, W., Modrow, S. (2002) The VP1-unique region of parvovirus B19 and its constituent phospholipase A2-like activity. *J. Virol.*, 76, 2014-2018.

30 Realizaciones preferidas de la presente invención:

1. Una proteína capsidial VP1 modificada del parvovirus B19 que tiene una actividad enzimática de tipo fosfolipasa A2 reducida en comparación con la proteína capsidial VP1 de tipo silvestre del parvovirus B19 que tiene la secuencia de aminoácidos de la Sec ID N°: 1.
2. La proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada porque** los restos aminoacídicos en la región única de VP-1 están modificados.
3. La proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizada porque** los restos aminoacídicos modificados residen en el centro activo de la fosfolipasa A2 en la proteína capsidial VP-1.
4. La proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada porque** uno o más de los restos aminoacídicos en el centro activo de la fosfolipasa A2 se modifican.
5. La proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizada porque** uno o más de los restos aminoacídicos se modifican en la posición 153: histidina; en la posición 157: tirosina; en la posición 162: lisina; y/o en la posición 168: tirosina.
6. La proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizada porque** la histidina 153 se modifica a alanina.
7. La proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizada porque** la tirosina 157 se modifica a fenilalanina.
8. La proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizada porque** la lisina 162 se modifica a leucina.
9. La proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizada porque** la tirosina 168 se modifica a fenilalanina.
10. La proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizada porque** la sustitución de los restos aminoacídicos se realiza por mutagénesis dirigida.
11. También se desvela una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

12. Adicionalmente se desvela un vector de expresión recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11.
13. Un vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizado porque** adicionalmente comprende una proteína capsidial VP2 del parvovirus B19.
- 5 14. Un vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado porque** la proteína capsidial VP1 modificada se fusiona con la proteína capsidial VP2.
15. Adicionalmente se desvela una célula huésped que comprende el vector de expresión recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14.
- 10 16. También se desvela la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 15 que es *E. coli*, una levadura, preferentemente *Saccharomyces cerevisiae* o células animales.
17. Adicionalmente se desvela un procedimiento de producción de la proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o el producto de fusión de la proteína capsidial VP1 modificada y la proteína capsidial VP2 de acuerdo con la reivindicación 14, usando la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 18 o 19.
- 15 18. También se desvela el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la proteína capsidial VP1 modificada y/o el producto de fusión de la proteína capsidial VP1 modificada y la proteína capsidial VP2 están aislados y/o purificados.
19. La proteína capsidial VP1 modificada o el producto de fusión de la proteína capsidial VP1 modificada y la proteína capsidial VP2 que pueden obtenerse usando el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17 o 18.
- 20 20. Adicionalmente se desvela la proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y 19, o el producto de fusión de la proteína capsidial VP1 modificada y la proteína capsidial VP2 de acuerdo con la reivindicación 19 para su uso como medicamentos.
21. También se desvela el uso de la proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y 19 a 20, con o sin proteína capsidial VP2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento contra una infección por parvovirus B19 y/o enfermedades autoinmunes y reumáticas asociadas al parvovirus B19.
- 25 22. Adicionalmente se desvela el uso del producto de fusión de la proteína capsidial VP1 modificada y de la proteína capsidial VP2 de acuerdo con la reivindicación 19 o 20 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento contra una infección por el parvovirus B19 y/o enfermedades autoinmunes y reumáticas asociadas al parvovirus B19.
- 30 23. También se desvela el uso de acuerdo con la reivindicación 21 o 22, **caracterizado por que** el tratamiento es contra artralgiyas; artritis; más preferentemente monoartritis, oligoartritis, poliartritis, artritis reumatoide y/o artritis idiopática juvenil; lupus eritematoso sistémico (LES); vasculitis, más preferentemente vasculitis leucocitoclástica, púrpura de Henlein-Schoenoch, síndrome papulopurpúrico en guantes y calcetines (SPPGC), enfermedad de Kawasaki, arteritis de células gigantes (ACG), poliarteritis nodosa y/o granulomatosis de Wegener; dermatomiositis; neutropenia autoinmune; trombocitopenia autoinmune; púrpura trombocitopénica idiopática (PTI); anemia hemolítica autoinmune; y/o síndrome hemofagocítico asociado a un virus (SHAV).
- 35 24. Adicionalmente se desvela el uso de la proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y 19 a 20, o el producto de fusión de la proteína capsidial VP1 modificada y la proteína capsidial de VP2 de acuerdo con la reivindicación 19 o 20, en un ensayo para detectar anticuerpos dirigidos contra la proteína VP1 del virus B19 en una muestra a ensayar.
- 40 25. También se desvela el uso de las células huésped de acuerdo con la reivindicación 15 o 16 en un ensayo para detectar anticuerpos dirigidos contra la proteína VP1 del virus B19 en una muestra a ensayar.
- 45 26. Adicionalmente se desvelan partículas recombinantes similares a un virus constituidas por la proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 19 a 20 con o sin proteína capsidial VP2.
27. También se desvelan partículas recombinantes similares a un virus constituidas por el producto de fusión de la proteína capsidial VP1 modificada y la proteína capsidial VP2 de acuerdo con la reivindicación 19 o 20.
- 50 28. Adicionalmente se desvela el uso de las partículas recombinantes similares a un virus de acuerdo con la reivindicación 26 o 27 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento contra la infección por parvovirus B19 y/o enfermedades autoinmunes y reumáticas asociadas al parvovirus B19.

29. También se desvela el uso de acuerdo con la reivindicación 28, **caracterizado porque** el tratamiento es contra tratamiento es contra artralgiyas; artritis; más preferentemente monoartritis, oligoartritis, poliartritis, artritis reumatoide y/o artritis idiopática juvenil; lupus eritematoso sistémico (LES); vasculitis, más preferentemente vasculitis leucocitoclástica, púrpura de Henlein-Schoenoch, síndrome papular purpúrico en guantes y calcetines (SPPGC), enfermedad de Kawasaki, arteritis de células gigantes (ACG), poliarteritis nodosa y/o granulomatosis de Wegener; dermatomiositis; neutropenia autoinmune; trombocitopenia autoinmune; púrpura trombocitopénica idiopática (PTI); anemia hemolítica autoinmune; y/o síndrome hemofagocítico asociado a virus (SHAV).
30. Adicionalmente se desvela el uso de las partículas recombinantes similares a un virus de acuerdo con la reivindicación 26 o 27 en un ensayo para detectar anticuerpos dirigidos contra la proteína VP1 del virus B19 en una muestra a ensayar.
31. Una composición farmacéutica, especialmente una preparación de vacuna para inducir una respuesta inmunitaria que proporciona protección contra el parvovirus humano B19, que comprende la proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 19 a 20, con o sin la proteína capsidial VP2.
32. Una composición farmacéutica, especialmente una preparación de vacuna para inducir una respuesta inmunitaria que proporciona protección contra el parvovirus humano B19, que comprende el producto de fusión de la proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con la reivindicación 19 o 20.
33. También se desvela una composición farmacéutica, especialmente una preparación de vacuna para inducir una respuesta inmunitaria que proporciona protección contra el parvovirus humano B19, que comprende las partículas recombinantes similares a un virus de acuerdo con la reivindicación 26 o 27.
34. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 33, que comprende adicionalmente uno o más transportadores y/o adyuvantes adecuados para los propósitos de vacunación.
35. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 34, que comprende adicionalmente una sustancia inmunoestimuladora, seleccionada preferentemente del grupo que comprende polímeros policatiónicos, especialmente polipéptidos policatiónicos, desoxinucleótidos inmunoestimuladores (ODN); péptidos que contienen al menos dos motivos LysLeuLys; compuestos neuroactivos, especialmente una hormona de crecimiento humana; alumbre, adyuvantes completos o incompletos de Freund o combinaciones de estos.
36. Adicionalmente se desvela un kit de diagnóstico que comprende:
- i) una proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, 19 o 20, y
  - ii) reactivos complementarios.
37. También se desvela un kit de diagnóstico que comprende:
- i) un producto de fusión de la proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con las reivindicaciones 19 o 20, y
  - ii) reactivos complementarios.
38. También se desvela un kit de diagnóstico que comprende:
- i) partículas recombinantes similares a un virus de acuerdo con la reivindicación 26 o 27, y
  - ii) Reactivos complementarios.
39. Adicionalmente se desvela el uso de la proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 19 a 20 con o sin proteína capsidial VP2 como un agente para modificar la actividad de una actividad de la fosfolipasa A2 huésped.
40. También se desvela el uso del producto de fusión de la proteína capsidial VP1 modificada de acuerdo con la reivindicación 19 o 20 como un agente para modificar la actividad de una actividad de la fosfolipasa A2 huésped.
41. Adicionalmente se desvela el uso de partículas recombinantes similares a un virus de acuerdo con la reivindicación 26 o 27 como un agente para modificar la actividad de una actividad de la fosfolipasa A2 huésped.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> AG inter celular
- <120> Parvovirus
- <130> R 55073 (divisional de R 49100)

ES 2 556 710 T3

<150> EP04450180.7  
 <151> 24-09-2005

<160> 4

5

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 781

10

<212> PRT

<213> Parvovirus B19

<400> 1

Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala  
 1 5 10

Lys Ala Val Tyr Gln Gln Phe Val Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly  
 20 25 30

Thr Asp Leu Glu Leu Ile Gln Ile Leu Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser  
 35 40 45

Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala  
 50 55 60

Arg Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His  
 65 70 75 80

Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp His Pro His Ala Leu Ser Ser  
 85 90 95

Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser  
 100 105 110

Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Gln Val Ser Val Gln Leu Pro Gly Thr  
 115 120 125

Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln Ser  
 130 135 140

Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile His Asp Phe Arg Tyr Ser Gln Leu  
 145 150 155 160

Ala Lys Leu Gly Ile Asn Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu  
 165 170 175

Glu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn Glu Thr Gly Phe Gln Ala Gln Val

15

ES 2 556 710 T3

180					185					190					
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Thr	Leu	Lys	Gly	Ala	Ala	Ala	Pro	Val	Ala	His
		195					200					205			
Phe	Gln	Gly	Ser	Leu	Pro	Glu	Val	Pro	Ala	Tyr	Asn	Ala	Ser	Glu	Lys
	210					215					220				
Tyr	Pro	Ser	Met	Thr	Ser	Val	Asn	Ser	Ala	Glu	Ala	Ser	Thr	Gly	Ala
225					230					235					240
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asn	Ser	Val	Lys	Ser	Met	Trp	Ser	Glu	Gly	Ala
				245					250					255	
Thr	Phe	Ser	Ala	Asn	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Phe	Ser	Arg	Gln	Phe	Leu
			260					265					270		
Ile	Pro	Tyr	Asp	Pro	Glu	His	His	Tyr	Lys	Val	Phe	Ser	Pro	Ala	Ala
		275					280					285			
Ser	Ser	Cys	His	Asn	Ala	Ser	Gly	Lys	Glu	Ala	Lys	Val	Cys	Thr	Ile
	290					295					300				
Ser	Pro	Ile	Met	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Arg	Tyr	Leu	Asp	Phe	Asn
305					310					315					320
Ala	Leu	Asn	Leu	Phe	Phe	Ser	Pro	Leu	Glu	Phe	Gln	His	Leu	Ile	Glu
				325					330					335	
Asn	Tyr	Gly	Ser	Ile	Ala	Pro	Asp	Ala	Leu	Thr	Val	Thr	Ile	Ser	Glu
			340					345					350		
Ile	Ala	Val	Lys	Asp	Val	Thr	Asp	Lys	Thr	Gly	Gly	Gly	Val	Gln	Val
		355					360					365			
Thr	Asp	Ser	Thr	Thr	Gly	Arg	Leu	Cys	Met	Leu	Val	Asp	His	Glu	Tyr
	370					375					380				
Lys	Tyr	Pro	Tyr	Val	Leu	Gly	Gln	Gly	Gln	Asp	Thr	Leu	Ala	Pro	Glu
385					390					395					400
Leu	Pro	Ile	Trp	Val	Tyr	Phe	Pro	Pro	Gln	Tyr	Ala	Tyr	Leu	Thr	Val
				405					410					415	
Gly	Asp	Val	Asn	Thr	Gln	Gly	Ile	Ser	Gly	Asp	Ser	Lys	Lys	Leu	Ala
			420					425					430		
Ser	Glu	Glu	Ser	Ala	Phe	Tyr	Val	Leu	Glu	His	Ser	Ser	Phe	Gln	Leu
		435					440					445			
Leu	Gly	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala	Ser	Met	Ser	Tyr	Lys	Phe	Pro	Pro	Val
	450					455					460				

ES 2 556 710 T3

Pro 465 Pro Gu Asn Leu Gu 470 Gly Oys Ser Gln His 475 Phe Tyr Gu Met Tyr 480  
 Asn Pro Leu Tyr Gly 485 Ser Arg Leu Gly Val 490 Pro Asp Thr Leu Gly 495 Gly  
 Asp Pro Lys Phe 500 Arg Ser Leu Thr His 505 Gu Asp His Ala Ile 510 Gln Pro  
 Gln Asn Phe 515 Met Pro Gly Pro Leu 520 Val Asn Ser Val Ser 525 Thr Lys Gu  
 Gly Asp 530 Ser Ser Asn Thr Gly 535 Ala Gly Lys Ala Leu 540 Thr Gly Leu Ser  
 Thr 545 Gly Thr Ser Gln Asn 550 Thr Arg Ile Ser Leu 555 Arg Pro Gly Pro Val 560  
 Ser Gln Pro Tyr His 565 His Trp Asp Thr Asp 570 Lys Tyr Val Thr Gly 575 Ile  
 Asn Ala Ile Ser 580 His Gly Gln Thr Thr 585 Tyr Gly Asn Ala Gu 590 Asp Lys  
 Gu Tyr Gln 595 Gln Gly Val Gly Arg 600 Phe Pro Asn Gu Lys 605 Gu Gln Leu  
 Lys Gln 610 Leu Gln Gly Leu Asn 615 Met His Thr Tyr Phe 620 Pro Asn Lys Gly  
 Thr 625 Gln Gln Tyr Thr Asp 630 Gln Ile Gu Arg Pro 635 Leu Met Val Gly Ser 640  
 Val Trp Asn Arg Arg 645 Ala Leu His Tyr Gu 650 Ser Gln Leu Trp Ser Lys 655  
 Ile Pro Asn Leu 660 Asp Asp Ser Phe Lys 665 Thr Gln Phe Ala Ala Leu Gly 670  
 Gly Trp Gly 675 Leu His Gln Pro Pro 680 Pro Gln Ile Phe Leu Lys Ile Leu 685  
 Pro Gln 690 Ser Gly Pro Ile Gly 695 Gly Ile Lys Ser Met 700 Gly Ile Thr Thr  
 Leu 705 Val Gln Tyr Ala Val 710 Gly Ile Met Thr Val 715 Thr Met Thr Phe Lys 720  
 Leu Gly Pro Arg Lys 725 Ala Thr Gly Arg Trp 730 Asn Pro Gln Pro Gly Val 735  
 Tyr Pro Pro His Ala Ala Gly His Leu Pro Tyr Val Leu Tyr Asp Pro

ES 2 556 710 T3

740

745

750

Thr Ala Thr Asp Ala Lys Gln His His Arg His Gly Tyr Glu Lys Pro  
755 760 765

Glu Glu Leu Trp Thr Ala Lys Ser Arg Val His Pro Leu  
770 775 780

- <210> 2
- <211> 781
- <212> PRT
- <213> Parvovirus B19
  
- <400> 2

ES 2 556 710 T3

Met Ser Lys Lys Ser Asp Lys Trp Trp Gu Ser Asp Asp Lys Phe Ala  
1 5 10 15

Lys Asp Val Tyr Lys Gln Phe Val Gu Phe Tyr Gu Lys Val Thr Gu  
20 25 30

Thr Asp Leu Gu Leu Ile Gln Ile Leu Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser  
35 40 45

Leu Asp Asn Pro Leu Gu Asn Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala  
50 55 60

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

Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Phe Asp His Pro His Ala Leu Ser Pro  
85 90 95

Ser Ser Ser His Thr Gu Pro Arg Gly Gu Asp Ala Val Leu Ser Ser  
100 105 110

Gu Asp Leu His Lys Pro Gly Gln Val Ser Ile Gln Leu Pro Gly Thr  
115 120 125

Asn Tyr Ile Gly Pro Gly Asn Gu Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln Ser  
130 135 140

Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile His Asp Phe Arg Tyr Ser Gln Leu  
145 150 155 160

Ala Lys Leu Gly Ile Asn Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Gu  
165 170 175

Gu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn Gu Thr Gly Phe Gln Ala Gln Ala  
180 185 190

Val Lys Asp Tyr Phe Thr Leu Lys Gly Ala Ala Ala Pro Val Ala His  
195 200 205

ES 2 556 710 T3

Phe G n G y Ser Leu Pro G u Val Pro Al a Tyr Asn Al a Ser G u Lys  
 210 215 220  
 Tyr Pro Ser Met Thr Ser Val Asn Ser Al a G u Al a Ser Thr G y Al a  
 225 230 235 240  
 G y G y G y G y Ser Asn Pro Val Lys Ser Met Tr p Ser G u G y Al a  
 245 250 255  
 Thr Phe Thr Al a Asn Ser Val Thr Cys Thr Phe Ser Arg G n Phe Leu  
 260 265 270  
 Ile Pro Tyr G u Pro G u His Arg Tyr Lys Val Phe Ser Pro Al a Al a  
 275 280 285  
 Ser Ser Cys His Asn Al a Ser G y Lys G u Al a Lys Val Cys Thr Ile  
 290 295 300  
 Ser Pro Ile Met G y Tyr Ser Thr Pro Tr p Arg Tyr Leu Asp Phe Asn  
 305 310 315 320  
 Al a Leu Asn Leu Phe Phe Ser Pro Leu G u Phe G n His Leu Ile G u  
 325 330 335  
 Asn Tyr G y Ser Ile Al a Pro Asp Al a Leu Thr Val Thr Ile Ser G u  
 340 345 350  
 Ile Al a Val Lys Asp Val Thr Asp Lys Thr G y G y G y Val G n Val  
 355 360 365  
 Thr Asp Ser Thr Thr G y Arg Leu Cys Met Leu Val Asp His G u Tyr  
 370 375 380  
 Lys Tyr Pro Tyr Val Leu G y G n G y G n Asp Thr Leu Al a Pro G u  
 385 390 395 400  
 Leu Pro Ile Tr p Val Tyr Phe Pro Pro G n Tyr Al a Tyr Leu Thr Al a  
 405 410 415  
 G y Asp Val Asn Thr G n G y Ile Ser G y Asp Ser Lys Lys Leu Al a  
 420 425 430  
 Ser G u G u Ser Al a Phe Tyr Val Leu G u His Ser Ser Phe G u Leu  
 435 440 445  
 Leu G y Thr G y G y Ser Al a Thr Met Ser Tyr Lys Phe Pro Pro Val  
 450 455 460  
 Pro Pro G u Asn Leu G u G y Cys Ser G n His Phe Tyr G u Met Tyr  
 465 470 475 480  
 Asn Pro Leu Tyr G y Ser Arg Leu G y Val Pro Asp Thr Leu G y G y  
 485 490 495

ES 2 556 710 T3

Asp Pro Lys Phe Arg Ser Leu Thr His Glu Asp His Ala Ile Gln Pro  
 500 505 510  
 Gln Asn Phe Met Pro Gly Pro Leu Val Asn Ser Val Ser Thr Lys Glu  
 515 520 525  
 Gly Asp Thr Ser Asn Thr Gly Ala Gly Lys Ala Leu Thr Gly Leu Ser  
 530 535 540  
 Thr Gly Thr Ser Gln Ser Thr Arg Ile Ser Leu Arg Pro Gly Pro Val  
 545 550 555 560  
 Ser Gln Pro Tyr His His Trp Asp Thr Asp Lys Tyr Val Thr Gly Ile  
 565 570 575  
 Asn Ala Ile Ser His Gly Gln Thr Thr Tyr Gly Asn Ala Glu Asp Lys  
 580 585 590  
 Glu Tyr Gln Gln Gly Val Gly Arg Phe Pro Asn Glu Lys Glu Gln Leu  
 595 600 605  
 Lys Gln Leu Gln Gly Leu Asn Ile His Thr Tyr Phe Pro Asn Lys Gly  
 610 615 620  
 Thr Gln Gln Tyr Thr Asp Gln Ile Glu Arg Pro Leu Met Val Gly Ser  
 625 630 635 640  
 Val Trp Asn Arg Arg Ala Leu His Tyr Glu Ser Gln Leu Trp Ser Lys  
 645 650 655  
 Ile Pro Asn Leu Asp Asp Ser Phe Lys Thr Gln Phe Ala Ala Leu Gly  
 660 665 670  
 Gly Trp Gly Leu His Gln Pro Pro Pro Gln Ile Phe Leu Lys Ile Leu  
 675 680 685  
 Pro Gln Ser Gly Pro Ile Gly Gly Ile Lys Ser Met Gly Ile Thr Thr  
 690 695 700  
 Leu Val Gln Tyr Ala Val Gly Ile Met Thr Val Thr Met Thr Phe Lys  
 705 710 715 720  
 Leu Gly Pro Arg Lys Ala Thr Gly Arg Trp Asn Pro Gln Pro Gly Val  
 725 730 735  
 Tyr Pro Pro His Ala Ala Gly His Leu Pro Tyr Val Leu Tyr Asp Pro  
 740 745 750  
 Thr Ala Thr Asp Ala Lys Gln His His Arg His Gly Tyr Glu Lys Pro  
 755 760 765

ES 2 556 710 T3

G u G u Leu Trp Thr Al a Lys Ser Arg Val Hi s Pro Leu  
770 775 780

- 5 <210> 3
- <211> 781
- <212> PRT
- <213> Parvovirus B19
- <400> 3

ES 2 556 710 T3

Met Ser Lys Thr Thr Asn Lys Trp Trp Gu Ser Ser Asp Lys Phe Ala  
1 5 10 15

Gln Asp Val Tyr Lys Gln Phe Val Gln Phe Tyr Gu Lys Ala Thr Gly  
20 25 30

Thr Asp Leu Gu Leu Ile Gln Ile Leu Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser  
35 40 45

Leu Asp Asn Pro Leu Gu Asn Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala  
50 55 60

Arg Ile Lys Ser Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His  
65 70 75 80

Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp His Pro His Ala Leu Ser Ser  
85 90 95

Ser Asn Ser Ser Ala Gu Pro Arg Gly Gu Asn Ala Val Leu Ser Ser  
100 105 110

Gu Asp Leu His Lys Pro Gly Gln Val Ser Ile Gln Leu Pro Gly Thr  
115 120 125

Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Gu Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln Asn  
130 135 140

Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile His Asp Phe Arg Tyr Ser Gln Leu  
145 150 155 160

Ala Lys Leu Gly Ile Asn Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Gu  
165 170 175

Gu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn Gu Thr Gly Phe Gln Ala Gln Ala  
180 185 190

Val Lys Asp Tyr Phe Thr Leu Lys Gly Ala Ala Ala Pro Val Ala His  
195 200 205

Phe Gln Gly Ser Leu Pro Gu Val Pro Ala Tyr Asn Ala Ser Gu Lys  
210 215 220

Tyr Pro Ser Met Thr Ser Val Asn Ser Ala Gu Ala Ser Thr Gly Ala  
225 230 235 240

ES 2 556 710 T3

Gly Gly Gly Gly Ser<sub>245</sub> Asn Pro Thr Lys Ser<sub>250</sub> Met Trp Ser Glu Gly<sub>255</sub> Ala  
 Thr Phe Thr Ala<sub>260</sub> Asn Ser Val Thr Cys<sub>265</sub> Thr Phe Ser Arg Glu<sub>270</sub> Phe Leu  
 Ile Pro Tyr<sub>275</sub> Asp Pro Glu His<sub>280</sub> His Tyr Lys Val Phe Ser<sub>285</sub> Pro Ala Ala  
 Ser Ser<sub>290</sub> Cys His Asn Ala Ser<sub>295</sub> Gly Lys Glu Ala Lys<sub>300</sub> Val Cys Thr Ile  
 Ser<sub>305</sub> Pro Ile Met Gly Tyr<sub>310</sub> Ser Thr Pro Trp Arg<sub>315</sub> Tyr Leu Asp Phe Asn<sub>320</sub>  
 Ala Leu Asn Leu Phe<sub>325</sub> Phe Ser Pro Leu Glu<sub>330</sub> Phe Glu His Leu Ile<sub>335</sub> Glu  
 Asn Tyr Gly Ser<sub>340</sub> Ile Ala Pro Asp Ala<sub>345</sub> Leu Thr Val Thr Ile<sub>350</sub> Ser Glu  
 Ile Ala Val<sub>355</sub> Lys Asp Val Thr Asp<sub>360</sub> Lys Thr Gly Gly<sub>365</sub> Gly Val Glu Val  
 Thr Asp<sub>370</sub> Ser Thr Thr Gly Arg<sub>375</sub> Leu Cys Met Leu Val<sub>380</sub> Asp His Glu Tyr  
 Lys Tyr Pro Tyr Val Leu<sub>390</sub> Gly Glu Gly Glu<sub>395</sub> Asp Thr Leu Ala Pro Glu<sub>400</sub>  
 Leu Pro Ile Trp Val<sub>405</sub> Tyr Phe Pro Pro Glu<sub>410</sub> Tyr Ala Tyr Leu Thr Val<sub>415</sub>  
 Gly Glu Val Asn<sub>420</sub> Thr Glu Gly Ile Ser<sub>425</sub> Gly Asp Ser Lys Lys<sub>430</sub> Leu Ala  
 Ser Glu Glu<sub>435</sub> Ser Ala Phe Tyr Val<sub>440</sub> Leu Glu His Ser Ser<sub>445</sub> Phe Glu Leu  
 Leu Gly<sub>450</sub> Thr Gly Gly Ser Ala<sub>455</sub> Thr Met Ser Tyr Lys<sub>460</sub> Phe Pro Ala Val  
 Pro<sub>465</sub> Pro Glu Asn Leu Glu<sub>470</sub> Gly Cys Ser Glu His<sub>475</sub> Phe Tyr Glu Met Tyr<sub>480</sub>  
 Asn Pro Leu Tyr Gly<sub>485</sub> Ser Arg Leu Gly Val<sub>490</sub> Pro Asp Thr Leu Gly<sub>495</sub> Gly  
 Asp Pro Lys Phe<sub>500</sub> Arg Ser Leu Thr His<sub>505</sub> Glu Asp His Ala Ile<sub>510</sub> Glu Pro  
 Glu Asn Phe Met Pro Gly Pro Leu Ile Asn Ser Val Ser Thr Lys Glu

ES 2 556 710 T3

	515					520					525				
Gly	Asp	Asn	Ser	Asn	Thr	Gly	Ala	Gly	Lys	Ala	Leu	Thr	Gly	Leu	Ser
	530					535					540				
Thr	Gly	Thr	Ser	Gln	Asn	Thr	Arg	Ile	Ser	Leu	Arg	Pro	Gly	Pro	Val
545					550					555					560
Ser	Gln	Pro	Tyr	His	His	Trp	Asp	Thr	Asp	Lys	Tyr	Val	Thr	Gly	Ile
				565					570					575	
Asn	Ala	Ile	Ser	His	Gly	Gln	Thr	Thr	Tyr	Gly	Asn	Ala	Glu	Asp	Lys
			580					585					590		
Glu	Tyr	Gln	Gln	Gly	Val	Gly	Arg	Phe	Pro	Asn	Glu	Lys	Glu	Gln	Leu
		595					600					605			
Lys	Gln	Leu	Gln	Gly	Leu	Asn	Met	His	Thr	Tyr	Phe	Pro	Asn	Lys	Gly
	610					615					620				
Thr	Gln	Gln	Tyr	Thr	Asp	Gln	Ile	Glu	Arg	Pro	Leu	Met	Val	Gly	Ser
625					630					635					640
Val	Trp	Asn	Arg	Arg	Ala	Leu	His	Tyr	Glu	Ser	Gln	Leu	Trp	Ser	Lys
				645					650					655	
Ile	Pro	Asn	Leu	Asp	Asp	Ser	Phe	Lys	Thr	Gln	Phe	Ala	Ala	Leu	Gly
			660					665					670		
Gly	Trp	Gly	Leu	His	Gln	Pro	Pro	Pro	Gln	Ile	Phe	Leu	Lys	Ile	Leu
		675					680					685			
Pro	Gln	Ser	Gly	Pro	Ile	Gly	Gly	Ile	Lys	Ser	Met	Gly	Ile	Thr	Thr
	690					695					700				
Leu	Val	Gln	Tyr	Ala	Val	Gly	Ile	Met	Thr	Val	Thr	Met	Thr	Phe	Lys
705					710					715					720
Leu	Gly	Pro	Arg	Lys	Ala	Thr	Gly	Arg	Trp	Asn	Pro	Gln	Pro	Gly	Val
				725					730					735	
Tyr	Pro	Pro	His	Ala	Ala	Gly	His	Leu	Pro	Tyr	Val	Leu	Tyr	Asp	Pro
			740					745					750		
Thr	Ala	Thr	Asp	Ala	Lys	Gln	His	His	Arg	His	Gly	Tyr	Glu	Lys	Pro
		755					760					765			
Glu	Glu	Leu	Trp	Thr	Ala	Lys	Ser	Arg	Val	His	Pro	Leu			
	770					775					780				

<210> 4  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> artificial

ES 2 556 710 T3

<220>  
<223> adyuvante

<400> 4

5

Lys Leu Lys Leu Leu Leu Leu Leu Lys Leu Lys  
1 5 10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un adyuvante y una proteína capsidial VP1 modificada de parvovirus B19 que tiene una sustitución de aminoácido en uno o más de entre histidina 153, tirosina 157, lisina 162 y/o tirosina 168, y que tiene una actividad enzimática fosfolipasa A2 reducida de al menos 30 % en comparación con la proteína capsidial VP1 de tipo silvestre de parvovirus B19 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la histidina 153 está sustituida con alanina, la tirosina 157 está sustituida con fenilalanina, la lisina 162 está sustituida con leucina y/o la tirosina 168 está sustituida con fenilalanina.
- 10 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, que adicionalmente comprende una proteína capsidial VP2.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en la que la proteína capsidial VP1 modificada está fusionada con la proteína capsidial VP2.
- 15 5. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el adyuvante es un desoxinucleótido inmunoestimulador, un péptido policatiónico, un péptido que contiene al menos dos motivos LysLeuLys, un compuesto neuroactivo, Alumbre, adyuvante completo de Freund o adyuvante incompleto de Freund.
6. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición farmacéutica es una preparación de vacuna que puede inducir una respuesta inmunitaria contra el parvovirus B19.

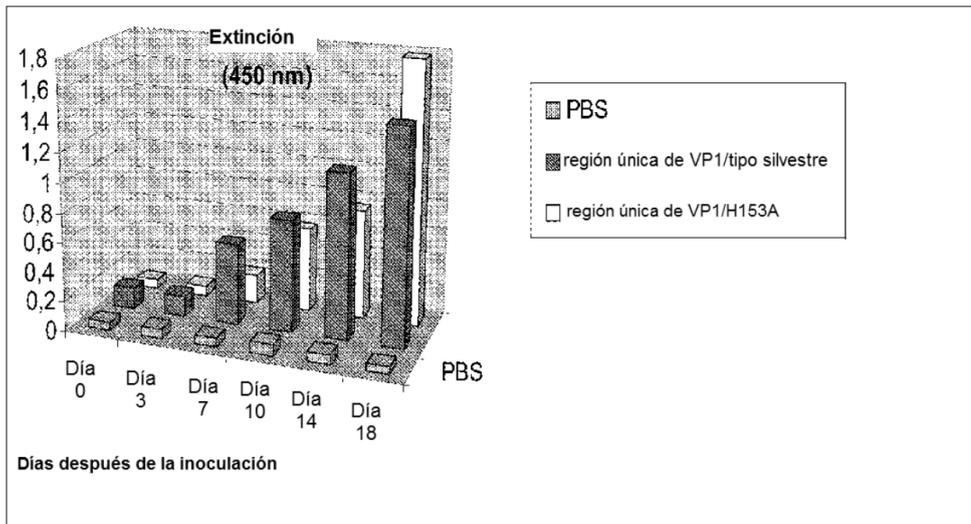


Fig.1

**Alineamientos de la proteína VP1 de Parvovirus (3 genotipos diferentes)**

```

GENOTIPO 1 (M13178)  MSKKSGKWWESDDKFAKAVYQQFVFFYEKVTGTDLELIQILKDHYNISLDNPLENPSSLF 60
GENOTIPO 2 (AY064475) MSKKSDKWWESDDKFAKDVYKQFVFFYEKVTGTDLELIQILKDHYNISLDNPLENPSSLF 60
GENOTIPO 3 (AX003421) MSKTTNKWWESDDKFAQDVYKQFVFFYEKATGTDLELIQILKDHYNISLDNPLENPSSLF 60
*****o*****oo*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****

GENOTIPO 1 (M13178)  DLVARIKNNLKNSPDLYSHHFQSHGQLSDHPHALSSSSSHAEPRGENAVLSSSEDLHKPGQ 120
GENOTIPO 2 (AY064475) DLVARIKSNLKDTPDLYSHHFQSHGQLFDHPHALSPSSSHTEPRGEDAVLSSSEDLHKPGQ 120
GENOTIPO 3 (AX003421) DLVARIKSNLKNSPDLYSHHFQSHGQLSDHPHALSSSNSSAEPRGENAVLSSSEDLHKPGQ 120
*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****

GENOTIPO 1 (M13178)  VSVQLPGTNYVGPGNELQAGPPQSAVDSAARIHDFRYSQLAKLGINPYTHWTVADEELLK 180
GENOTIPO 2 (AY064475) VSVQLPGTNYVGPGNELQAGPPQSAVDSAARIHDFRYSQLAKLGINPYTHWTVADEELLK 180
GENOTIPO 3 (AX003421) VSVQLPGTNYVGPGNELQAGPPQNAVDSAARIHDFRYSQLAKLGINPYTHWTVADEELLK 180
**o*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****

GENOTIPO 1 (M13178)  NIKNETGFQAQAVKDYFTLKGAAPVAHFQGSLEVPAYNASEKYPMSMTSVNSAEASTGA 240
GENOTIPO 2 (AY064475) NIKNETGFQAQAVKDYFTLKGAAPVAHFQGSLEVPAYNASEKYPMSMTSVNSAEASTGA 240
GENOTIPO 3 (AX003421) NIKNETGFQAQAVKDYFTLKGAAPVAHFQGSLEVPAYNASEKYPMSMTSVNSAEASTGA 240
*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****

GENOTIPO 1 (M13178)  GGGGSNSVKSMWSEGATFTANSVTCTFSRQFLIPYDPEHHYKVFSPAASSCHNASGKEAK 300
GENOTIPO 2 (AY064475) GGGGSNSVKSMWSEGATFTANSVTCTFSRQFLIPYDPEHHYKVFSPAASSCHNASGKEAK 300
GENOTIPO 3 (AX003421) GGGGSNSVKSMWSEGATFTANSVTCTFSRQFLIPYDPEHHYKVFSPAASSCHNASGKEAK 300
*****oo*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****

GENOTIPO 1 (M13178)  VCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFFSPLEFQHLIENYGS IAPDALTVTISEIAVKDVTD 360
GENOTIPO 2 (AY064475) VCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFFSPLEFQHLIENYGS IAPDALTVTISEIAVKDVTD 360
GENOTIPO 3 (AX003421) VCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFFSPLEFQHLIENYGS IAPDALTVTISEIAVKDVTD 360
*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****

GENOTIPO 1 (M13178)  KTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQGQDTLAPELPIWVYFPPQYAYLTAGDVN 420
GENOTIPO 2 (AY064475) KTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQGQDTLAPELPIWVYFPPQYAYLTAGDVN 420
GENOTIPO 3 (AX003421) KTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQGQDTLAPELPIWVYFPPQYAYLTAGDVN 420
*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****o*****
    
```

Fig.2

ES 2 556 710 T3

```

GENOTIPO 1 (M13178)  TQGISGDSKKLASEESAFYVLEHSSFQLLGTGGTASMSYKFPVPPENLEGCSQHFYEMY 480
GENOTIPO 2 (AY064475) TQGISGDSKKLASEESAFYVLEHSSFQLLGTGGTASMSYKFPVPPENLEGCSQHFYEMY 480
GENOTIPO 3 (AX003421) TQGISGDSKKLASEESAFYVLEHSSFQLLGTGGTASMSYKFPVPPENLEGCSQHFYEMY 480
*****O*****O*****O*****

GENOTIPO 1 (M13178)  NPLYGSRLGVPDPTLGGDPKFRSLTHEDHAIQPQNFMPGPLVNSVSTKEGDSNTGAGKAL 540
GENOTIPO 2 (AY064475) NPLYGSRLGVPDPTLGGDPKFRSLTHEDHAIQPQNFMPGPLVNSVSTKEGDSNTGAGKAL 540
GENOTIPO 3 (AX003421) NPLYGSRLGVPDPTLGGDPKFRSLTHEDHAIQPQNFMPGPLVNSVSTKEGDSNTGAGKAL 540
*****O*****O*****

GENOTIPO 1 (M13178)  TGLSTGTSQNTRISLRPGPVSQPYHHWDTDKYVTGINAISHGQTTYGNAEDKEYQQGVGR 600
GENOTIPO 2 (AY064475) TGLSTGTSQNTRISLRPGPVSQPYHHWDTDKYVTGINAISHGQTTYGNAEDKEYQQGVGR 600
GENOTIPO 3 (AX003421) TGLSTGTSQNTRISLRPGPVSQPYHHWDTDKYVTGINAISHGQTTYGNAEDKEYQQGVGR 600
*****O*****

GENOTIPO 1 (M13178)  FPNEKEQLKQLQGLNMHTYFPNKGTTQYTDQIERPLMVGSVWNRALHYESQLWSKIPNL 660
GENOTIPO 2 (AY064475) FPNEKEQLKQLQGLNMHTYFPNKGTTQYTDQIERPLMVGSVWNRALHYESQLWSKIPNL 660
GENOTIPO 3 (AX003421) FPNEKEQLKQLQGLNMHTYFPNKGTTQYTDQIERPLMVGSVWNRALHYESQLWSKIPNL 660
*****O*****

GENOTIPO 1 (M13178)  DDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKILPQSGPIGGIKSMGITTLLVQYAVGIMVTMTFK 720
GENOTIPO 2 (AY064475) DDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKILPQSGPIGGIKSMGITTLLVQYAVGIMVTMTFK 720
GENOTIPO 3 (AX003421) DDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKILPQSGPIGGIKSMGITTLLVQYAVGIMVTMTFK 720
*****

GENOTIPO 1 (M13178)  LGPRKATGRWNPQPGVYPPHAAGHLPYVLYDPTATDAKQHRHGYEKPEELWTAKSRVHP 780
GENOTIPO 2 (AY064475) LGPRKATGRWNPQPGVYPPHAAGHLPYVLYDPTATDAKQHRHGYEKPEELWTAKSRVHP 780
GENOTIPO 3 (AX003421) LGPRKATGRWNPQPGVYPPHAAGHLPYVLYDPTATDAKQHRHGYEKPEELWTAKSRVHP 780
*****

GENOTIPO 1 (M13178)  L 781
GENOTIPO 2 (AY064475) L 781
GENOTIPO 3 (AX003421) L 781
*
```

aminoácidos conservados en los 3 genotipos: 743 / 781 (95%)

alienamiento realizado por CLUSTAL W (1,8) alineamiento de secuencia múltiple

Fig.2 ct