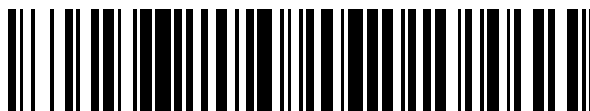


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 129**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/005** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2012 PCT/US2012/048200**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2013 WO13016460**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2012 E 12743037 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2736921**

54 Título: **Composiciones y métodos para evaluar la inmunogenicidad funcional de vacunas contra parvovirus**

30 Prioridad:

**25.07.2011 US 201161511211 P**  
**04.01.2012 US 201261583116 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.10.2018**

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)**  
**Rue de l'Institut 89**  
**1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**SETTEMBRE, ETHAN y**  
**CHANDRAMOULI, SUMANA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 687 129 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

Composiciones y métodos para evaluar la inmunogenicidad funcional de vacunas contra parvovirus

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a los campos de evaluar la inmunogenicidad de vacunas y tratamientos, identificar sujetos que pueden estar en riesgo de infección vírica, y determinar una relación de la actividad neutralizadora en preparaciones de anticuerpos. Aunque no está limitada a un virus específico, la presente invención también se refiere al campo de las vacunas y tratamientos contra parvovirus B19.

**Antecedentes**

10 Los miembros de la familia *Parvoviridae* son virus icosaédricos sin envuelta que contienen genomas de ADN lineal monocatenario. Los miembros de esta familia infectan una diversidad de vertebrados, incluyendo seres humanos, ratones, mustélidos, zorrillos, mapaches, reses, cánidos, primates y patos, así como insectos. Parvovirus B19, un miembro del género *Erythrovirus*, es patógeno en seres humanos. La infección por parvovirus B19 ocasiona dolencias leves, autolimitantes en individuos inmunocomprometidos, hematológicamente normales; sin embargo, puede causar dolencias graves en individuos con cáncer tal como leucemia, anemia drepanocítica u otros tipos de anemia crónica, en los nacidos con deficiencias inmunitarias, los que han recibido un trasplante de órgano, o los que tienen el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En tales individuos, parvovirus B19 puede causar anemia severa, tanto crónica como aguda. La infección por parvovirus B19 en mujeres embarazadas también está asociada con hidropesía fetal debida a anemia fetal severa, conduciendo a veces a aborto espontáneo o muerte fetal. La presentación más común de parvovirus B19 es un exantema en la niñez denominado quinta enfermedad o eritema infeccioso, denominado habitualmente como síndrome de la mejilla abofeteada.

15 Los géneros de parvovirus que infectan vertebrados (*Parvovirus*, *Erythrovirus*, *Dependovirus*, *Ambovirus* y *Bocavirus*) tienen una cápside vírica formada por al menos dos proteínas estructurales, VP1 y VP2. Por ejemplo, la cápside de parvovirus B19 consiste en una proteína estructural menor de 83 kDa, VP1, y una proteína estructural principal de 58 kDa, VP2, que se encuentran en una relación de ~5% a ~95% (Ozawa *et al. J. Virol.* 61(8): 2627- 30 (1987)). Las secuencias de las dos proteínas son colineales, siendo VP2 idéntica a la región del extremo terminal carboxilo de VP1; sin embargo, VP1 comprende unos 227 aminoácidos adicionales en el extremo terminal amino, que es conocida como la región única de VP1. Las proteínas de la cápside para los demás miembros del género parvovirus que infectan vertebrados tienen una relación estructural similar, aunque la región única de VP1 de estos otros miembros es por lo general más corta.

20 La región única de VP1 de parvovirus B19 es conocida por contener epítomos reconocidos por los anticuerpos neutralizadores de larga duración que se generan durante la infección natural por parvovirus (Modrow S and Dorsch S. *Pathol Biol* (Paris). 50: 326-331 (2002)). Adicionalmente, algunos experimentos con partículas semejantes a virus muestran que los anticuerpos neutralizadores son generados únicamente cuando la región única de VP1 está presente (Young NS and Brown KE. *NEJM.* 350:586-597 (2004)). Sin embargo, hasta ahora, no se ha desarrollado vacuna o tratamiento práctico de larga duración para la infección por parvovirus que infecta principalmente a seres humanos.

25 Las cápsides de VP1 modificadas con mutaciones en el sitio activo para fosfolipasa A<sub>2</sub>, localizados en la región única, se han descrito en el documento US2007/0286870. Sin embargo, como se enseña de forma expresa en el párrafo 11 de esta solicitud, estos cambios están limitados a aquellos que “no alteran de forma significativa el comportamiento inmunológico de la vacuna (es decir, que las propiedades inmunogénicas no se verán afectadas de forma adversa por la mutación).”

30 Preparaciones que contienen concentrado de inmunoglobulinas humanas se usan a veces para tratar infecciones crónicas por parvovirus B19 en individuos inmunodeficientes. Sin embargo, las inyecciones de concentrado de inmunoglobulinas no son suficientemente prácticas, de larga duración, o asequibles para el uso extendido o profiláctico de rutina. Excluyendo aquellas con la quinta enfermedad de interacción social, por ejemplo, en el trabajo, centros para el cuidado a niños, o colegios, no es una forma efectiva de prevenir la difusión del virus, debido a que los individuos son contagiosos bastante antes de desarrollar el característico exantema. Además, no todas las citadas preparaciones que contienen concentrado de inmunoglobulinas (IV-Ig) son efectivas puesto que estas pueden no contener anticuerpos capaces de neutralizar parvovirus B19. Pruebas actuales de lotes de IV-Ig no discriminan entre la presencia de anticuerpos no neutralizadores y neutralizadores frente a parvovirus B19. Esto crea incertidumbre con respecto a la potencia de un lote de IV-Ig para el tratamiento de infecciones por parvovirus B19. La incertidumbre respecto a la potencia antivírica podría dar como resultado la administración de una dosis insuficiente, necesitando inyecciones múltiples para el tratamiento de infección o podría dar como resultado que un paciente recibe más IV-Ig de la necesaria para el tratamiento. Así, existe una necesidad de métodos mejorados para la estimación del nivel de anticuerpos neutralizadores para asegurar que un paciente es tratado con una cantidad apropiada de IV-IG.

35 Además, a pesar de que se conoce en la técnica, sigue existiendo una necesidad de desarrollar vacunas contra parvovirus y tratamientos, y métodos para identificar individuos que pueden estar en riesgo de infección. El desarrollo actual y el uso después del desarrollo de vacunas contra parvovirus B19 y tratamientos está obstaculizado por la falta de un medio asequible, sencillo y rápido para medir una relación mutua de protección. El conocimiento de infecciones

5 por parvovirus en humanos y animales continúa avanzando, como se indica por el reciente descubrimiento de bocavirus humano como un agente causante de la enfermedad. Así, se prevé la necesidad de desarrollar vacunas relacionadas y ensayos serológicos frente a otros parvovirus. Un experto en la técnica puede aplicar fácilmente las enseñanzas de esta descripción a otros parvovirus cuando se descubran. En la actualidad, la capacidad de una vacuna  
 10 contra parvovirus B19 de inducir anticuerpos funcionales contra el virus y la potencia de los candidatos terapéuticos puede evaluarse únicamente detectando directamente la neutralización de infección vírica usando ensayos basados en células que son costosos, complicados, inconvenientes y necesitan tiempo puesto que requieren el uso de reaccionantes tales como células progenitoras eritroides que deben cultivarse antes de que puedan usarse en el ensayo. Tales ensayos también presentan alta variabilidad en los resultados (Wong *et al. J. Clin. Virol.* 35: 407-413 (2007)). Así, existe también la necesidad de métodos desarrollados para evaluar las concentraciones de anticuerpos  
 15 funcionales inducidas por tales vacunas para permitir el desarrollo efectivo de tales vacunas y posteriormente el uso efectivo después de haberse desarrollado.

### Compendio de la invención

15 La invención proporciona un polipéptido que comprende una región única de VP1 de parvovirus mutante donde un epítipo que incluye la secuencia que se extiende desde el aminoácido que está alineado con el aminoácido 167 de VP1 de parvovirus B19 hasta el aminoácido que está alineado con el aminoácido 171 de VP1 de parvovirus B19 se ha mutado para alterar sus propiedades antigénicas, donde la región única de VP1 de parvovirus mutante tiene al menos un 80% de identidad con la secuencia de tipo silvestre correspondiente de la región única de VP1 o comprende  
 20 al menos 40 aminoácidos consecutivos de la secuencia de tipo silvestre correspondiente de la región única de VP1, donde la región única de VP1 de parvovirus mutante no presenta reacción cruzada con anticuerpos que se unen a parvovirus VP2, y donde el polipéptido es capaz de inducir anticuerpos neutralizadores de parvovirus.

La invención proporciona además un método para evaluar la inmunogenicidad funcional de un componente de vacuna contra parvovirus que comprende:

- 25 (i) proporcionar una preparación de anticuerpos de un sujeto inoculado con un componente de vacuna contra parvovirus;
- (ii) poner en contacto la preparación de anticuerpos con un polipéptido de la invención; y
- (iii) evaluar la inmunogenicidad funcional de un componente de vacuna contra parvovirus detectando si la preparación de anticuerpos se une al polipéptido, opcionalmente donde el componente de vacuna contra parvovirus es una proteína, un proteoglicano, una lipoproteína, una vesícula de membrana externa, una partícula  
 30 semejante a virus, o un virus entero.

La invención también proporciona un método para determinar la potencia de una preparación de anticuerpos contra parvovirus, donde el método comprende:

- (i) proporcionar una preparación de anticuerpos;
- (ii) poner en contacto la preparación de anticuerpos con un polipéptido de la invención; y  
 35 (iii) evaluar la potencia detectando si la preparación de anticuerpos se une al polipéptido, opcionalmente donde la preparación de anticuerpos es un concentrado de inmunoglobulinas.

La invención también proporciona un método para medir una relación de la actividad neutralizadora para evaluar una profilaxis o un tratamiento para la infección por parvovirus que comprende:

- 40 (i) proporcionar una preparación de anticuerpos de un sujeto que ha recibido la profilaxis o el tratamiento para la infección por parvovirus;
- (ii) poner en contacto la preparación de anticuerpos con un polipéptido de la invención; y
- (iii) medir una relación de la actividad neutralizadora para evaluar la profilaxis o el tratamiento para la infección por parvovirus detectando si la preparación de anticuerpos se une al polipéptido, opcionalmente donde el tratamiento para la infección por parvovirus es la administración de un concentrado de inmunoglobulinas y opcionalmente  
 45 donde la profilaxis para la infección por parvovirus es la administración de una vacuna contra parvovirus.

La presente invención aborda estas necesidades proporcionando polipéptidos de la región única de VP1 de parvovirus mutante que pueden usarse para determinar si una preparación de anticuerpos es probable que contenga anticuerpos neutralizadores de parvovirus, composiciones que comprenden tales polipéptidos, y métodos para preparar tales composiciones. Estos polipéptidos pueden usarse para inducir anticuerpos neutralizadores de parvovirus. La presente  
 50 invención también proporciona métodos que hacen uso de la capacidad de estos polipéptidos de la región única de VP1 de parvovirus mutante para determinar si una preparación de anticuerpos es probable que contenga anticuerpos neutralizadores de parvovirus, por ejemplo, métodos para evaluar la inmunogenicidad funcional de vacunas contra parvovirus y para medir una relación de eficacia para un tratamiento de infección por parvovirus.

- Un aspecto de la invención es un polipéptido que tiene una región única de VP1 de parvovirus mutante donde un epítipo para anticuerpos de parvovirus no neutralizadores se ha mutado para alterar sus propiedades antigénicas. Otro aspecto de la invención es un polipéptido que tiene una región única de VP1 de parvovirus mutante donde una reacción cruzada del epítipo con anticuerpos que se unen a parvovirus VP2 se ha mutado para reducir la reactividad cruzada. Aun otro aspecto de la invención es un polipéptido que tiene una región única de VP1 de parvovirus mutante donde un epítipo que incluye la secuencia que se extiende desde el aminoácido que está alineado con el aminoácido 167 de VP1 de parvovirus B19 hasta el aminoácido que está alineado con el aminoácido 171 de VP1 de parvovirus B19 se ha mutado para alterar sus propiedades antigénicas.
- En determinadas formas de realización de los aspectos anteriores donde un epítipo para anticuerpos de parvovirus no neutralizadores o un epítipo que incluye la secuencia que se extiende desde el aminoácido que está alineado con el aminoácido 167 de VP1 de parvovirus B19 hasta el aminoácido que está alineado con el aminoácido 171 de VP1 de parvovirus B19 se ha mutado, el epítipo puede no presentar reacción cruzada con anticuerpos que se unen a parvovirus VP2.
- En determinadas formas de realización de los aspectos donde un epítipo para anticuerpos de parvovirus no neutralizadores o un epítipo de reacción cruzada con anticuerpos que se une a VP2 de parvovirus se ha inactivado, el epítipo puede incluir la secuencia que se extiende desde el aminoácido que está alineado con el aminoácido 167 de VP1 de parvovirus B19 hasta el aminoácido que está alineado con el aminoácido 171 de VP1 de parvovirus B19.
- En determinadas formas de realización de los aspectos y formas de realización precedentes, el polipéptido puede ser aislado o purificado sustancialmente o recombinante.
- En otras formas de realización de los aspectos y formas de realización precedentes, el epítipo tiene al menos una mutación, al menos dos mutaciones, al menos tres mutaciones, al menos cuatro mutaciones o al menos cinco mutaciones.
- Aun en otras formas de realización de cualquiera de los aspectos y formas de realización precedentes, el epítipo tiene al menos una mutación. El epítipo puede tener al menos una mutación en el aminoácido que está alineado con el aminoácido 171 de VP1 de parvovirus B19.
- Aun en otras formas de realización de cualquiera de los aspectos y formas de realización precedentes, el epítipo tiene al menos dos mutaciones. El epítipo puede tener al menos una mutación en el aminoácido que está alineado con el aminoácido 170 de VP1 de parvovirus B19 y una mutación en el aminoácido que está alineado con el aminoácido 171 de VP1 de parvovirus B19.
- Aun en otras formas de realización de cualquiera de los aspectos y formas de realización precedentes, el epítipo tiene al menos tres mutaciones. El epítipo puede tener al menos una mutación en el aminoácido que está alineado con el aminoácido 167 de VP1 de parvovirus B19, una mutación en el aminoácido que está alineado con el aminoácido 170 de VP1 de parvovirus B19, y una mutación en el aminoácido que está alineado con el aminoácido 171 de VP1 de parvovirus B19.
- En formas de realización de cualquiera de las formas de realización precedentes que tienen una mutación, la mutación puede ser una eliminación. En formas de realización de cualquiera de las formas de realización precedentes donde el epítipo tiene una mutación, la mutación puede ser una eliminación. Aun en otras formas de realización de cualquiera de las formas de realización precedentes donde el epítipo tiene una mutación, la mutación puede ser una sustitución. En otras formas de realización de cualquiera de las formas de realización precedentes donde el epítipo tiene una mutación, la mutación puede ser una inserción. En otras formas de realización de cualquiera de las formas de realización precedentes donde el epítipo tiene una mutación, la cual en determinadas formas de realización de cualquiera de las formas de realización precedentes no es una mutación Y168F o una mutación H170Y o una W171L.
- En cualquiera de los aspectos y formas de realización precedentes, la región única de VP1 de parvovirus mutante puede tener un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1, 80% de identidad con SEQ ID NO: 1, 90% de identidad con SEQ ID NO: 1, o 95% de identidad con SEQ ID NO: 1, 97% de identidad con SEQ ID NO: 1, 98% de identidad con SEQ ID NO: 1, o 99% de identidad con SEQ ID NO: 1. En cualquiera de los aspectos y formas de realización precedentes, la región única de VP1 de parvovirus mutante puede tener un 70% de identidad con SEQ ID NO: 4, 80% de identidad con SEQ ID NO: 4, 90% de identidad con SEQ ID NO: 4, o 95% de identidad con SEQ ID NO: 4, 97% de identidad con SEQ ID NO: 4, 98% de identidad con SEQ ID NO: 4, o 99% de identidad con SEQ ID NO: 4. En cualquiera de los aspectos y formas de realización precedentes, la región única de VP1 de parvovirus mutante puede tener un 70% de identidad con SEQ ID NO: 5, 80% de identidad con SEQ ID NO: 5, 90% de identidad con SEQ ID NO: 5, o 95% de identidad con SEQ ID NO: 5, 97% de identidad con SEQ ID NO: 5, 98% de identidad con SEQ ID NO: 5, o 99% de identidad con SEQ ID NO: 5. En cualquiera de los aspectos y formas de realización precedentes, la región única de VP1 de parvovirus mutante puede tener un 70% de identidad con SEQ ID NO: 6, 80% de identidad con SEQ ID NO: 6, 90% de identidad con SEQ ID NO: 6, o 95% de identidad con SEQ ID NO: 6, 97% de identidad con SEQ ID NO: 6, 98% de identidad con SEQ ID NO: 6, o 99% de identidad con SEQ ID NO: 6.
- En cualquiera de los aspectos y formas de realización precedentes, el parvovirus puede ser un miembro de los géneros *Erythrovirus*, *Dependovirus* o *Bocavirus*. En una forma de realización preferida, el parvovirus es B19 en cualquiera de

los aspectos y formas de realización precedentes.

Otro aspecto de la invención es una composición inmunogénica que incluye el polipéptido de cualquiera de los aspectos y formas de realización precedentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 Aún otro aspecto de la invención es un polinucleótido que codifica cualquiera de los aspectos y formas de realización precedentes de polipéptidos de la invención.

10 Aún otro aspecto es una vacuna que incluye las composiciones inmunogénicas o polinucleótidos descritos en los aspectos anteriores. En algunas formas de realización, la vacuna incluye además un adyuvante, por ejemplo, una emulsión mubmicrométrica que comprende escualeno y polisorbato 80. Un aspecto relacionado de la invención es un método para provocar una respuesta inmunitaria a parvovirus en un sujeto administrando las composiciones inmunogénicas, polinucleótidos, o vacunas de los aspectos y formas de realización precedentes.

15 Otro aspecto es una célula huésped que incluye un plásmido que codifica cualquiera de los polipéptidos de cualquiera de los aspectos y formas de realización anteriores relacionados con polipéptidos. Un aspecto relacionado es un método de producción de un polipéptido que comprende proporcionar una célula huésped que incluye el polinucleótido del aspecto anterior ligado operativamente a un promotor operable bajo condiciones por las cuales se expresa el polipéptido codificado; y recuperar el polipéptido de la célula huésped.

20 Un aspecto de la invención es un método para evaluar la inmunogenicidad funcional de un componente de vacuna contra parvovirus que comprende proporcionar una preparación de anticuerpos de un sujeto inoculado con un componente de vacuna contra parvovirus; poner en contacto la preparación de anticuerpos con el polipéptido de cualquiera de los aspectos y formas de realización anteriores relacionados con polipéptidos; y evaluar la inmunogenicidad funcional de un componente de vacuna contra parvovirus detectando si la preparación de anticuerpos se une al polipéptido. En algunas formas de realización, el componente de vacuna contra parvovirus es una proteína, un proteoglicano, una lipoproteína, una vesícula de membrana externa, una partícula semejante a un virus, o un virus entero. En una forma de realización preferida, el componente de vacuna contra parvovirus incluye un polipéptido de cualquiera de los aspectos y formas de realización anteriores.

25 Otro aspecto de la descripción es un método para identificar sujetos que pueden estar en riesgo de infección por parvovirus que comprende proporcionar una preparación de anticuerpos de un sujeto que puede estar en riesgo de infección por parvovirus; poner en contacto la preparación de anticuerpos con el polipéptido de cualquiera de los aspectos y formas de realización anteriores relacionados con polipéptidos; e identificar sujetos que pueden estar en riesgo de infección por parvovirus detectando si la preparación de anticuerpos se une al polipéptido. En algunas formas de realización, el sujeto puede estar en riesgo de infección debido a que se ha expuesto a parvovirus o puede haber estado en un entorno que probablemente contenga parvovirus.

30 Aún otro aspecto de la descripción es un método para determinar si una preparación de anticuerpos es probable que contenga anticuerpos neutralizadores de parvovirus que comprende proporcionar una preparación de anticuerpos; poner en contacto la preparación de anticuerpos con el polipéptido de cualquiera de los aspectos y formas de realización anteriores relacionados con polipéptidos; y determinar si la preparación de anticuerpos se une al polipéptido. En algunas formas de realización, la preparación de anticuerpos es un concentrado de inmunoglobulinas.

35 Aún otro aspecto de la invención es un método para determinar la potencia de una preparación de anticuerpos contra parvovirus que comprende proporcionar una preparación de anticuerpos; poner en contacto la preparación de anticuerpos con el polipéptido de cualquiera de los aspectos y formas de realización anteriores de cualquiera de los aspectos y formas de realización anteriores relacionados con polipéptidos; y evaluar la potencia detectando si la preparación de anticuerpos se une al polipéptido. En algunas formas de realización, la preparación de anticuerpos es un concentrado de inmunoglobulinas. En algunas formas de realización que pueden combinarse con las formas de realización precedentes, el método incluye una etapa adicional de ajustar una dosis de la preparación de anticuerpos usando la potencia evaluada.

40 Otro aspecto de la descripción es un método para medir una relación de eficacia para evaluar una profilaxis o un tratamiento para infección por parvovirus que comprende proporcionar una preparación de anticuerpos de un sujeto que ha recibido la profilaxis o el tratamiento para infección por parvovirus; poner en contacto la preparación de anticuerpos con el polipéptido de cualquiera de los aspectos y formas de realización anteriores relacionados con polipéptidos; y medir una relación de eficacia para evaluar la profilaxis o el tratamiento para infección por parvovirus detectando si la preparación de anticuerpos se une al polipéptido. En algunas formas de realización, el tratamiento para infección por parvovirus es la administración de un concentrado de inmunoglobulinas. En otras formas de realización, la profilaxis para infección por parvovirus es la administración de una vacuna contra parvovirus.

45 Aún otro aspecto de la invención es un método para medir una relación de actividad neutralizadora para evaluar una profilaxis o tratamiento para infección por parvovirus que comprende proporcionar una preparación de anticuerpos de un sujeto que ha recibido la profilaxis o el tratamiento para infección por parvovirus; poner en contacto la preparación de anticuerpos con el polipéptido de cualquiera de los aspectos y formas de realización anteriores relacionados con polipéptidos; y medir una relación de actividad neutralizadora para evaluar la profilaxis o el tratamiento para infección

por parvovirus detectando si la preparación de anticuerpos se une al polipéptido. En algunas formas de realización, el tratamiento para infección por parvovirus es la administración de un concentrado de inmunoglobulinas. En otras formas de realización, la profilaxis para infección por parvovirus es la administración de una vacuna contra parvovirus.

5 Aún otro aspecto de la invención es un método para medir una relación de protección para evaluar una profilaxis o tratamiento para infección por parvovirus que comprende proporcionar una preparación de anticuerpos de un sujeto que ha recibido la profilaxis o el tratamiento para infección por parvovirus; poner en contacto la preparación de anticuerpos con el polipéptido de cualquiera de los aspectos y formas de realización anteriores relacionados con polipéptidos; y medir una relación de protección para evaluar una profilaxis o tratamiento para infección por parvovirus detectando si la preparación de anticuerpos se une al polipéptido. En algunas formas de realización, el tratamiento para infección por parvovirus es la administración de un concentrado de inmunoglobulinas. En algunas otras formas de realización, la profilaxis para infección por parvovirus es la administración de una vacuna contra parvovirus.

10 Aún otro aspecto de la descripción es un método para medir una relación de potencia inmunoproláctica o inmunoterápica para evaluar una profilaxis o tratamiento para infección por parvovirus que comprende proporcionar una preparación de anticuerpos de un sujeto que ha recibido la profilaxis o el tratamiento para infección por parvovirus; poner en contacto la preparación de anticuerpos con el polipéptido de cualquiera de los aspectos y formas de realización anteriores relacionados con polipéptidos; y medir la potencia inmunoproláctica o inmunoterápica para evaluar una profilaxis o tratamiento para infección por parvovirus detectando si la preparación de anticuerpos se une al polipéptido. En algunas formas de realización, el tratamiento para infección por parvovirus es la administración de un concentrado de inmunoglobulinas. En algunas otras formas de realización, la profilaxis para infección por parvovirus es la administración de una vacuna contra parvovirus.

15 En cualquiera de los aspectos y formas de realización preferentes relacionados con los métodos, la etapa de detección puede llevarse a cabo con un ensayo ELISA, un radioinmunoensayo, un inmunoensayo fluorométrico, o un ensayo de aglutinación con látex. En una forma de realización preferida, la detección se lleva a cabo con un ensayo ELISA. La enzima del ensayo ELISA puede ser peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa o acetilcolinesterasa. El ensayo ELISA puede usar un sustrato cromogénico, radiomarcado o fluorescente.

20 En otras formas de realización, la preparación de anticuerpos en cualquiera de los aspectos o formas de realización precedentes relacionado con los métodos puede ser una muestra de suero que comprende anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados con antígeno, o una combinación de dos o más de los anteriores.

30 Otro aspecto de la invención es un kit para llevar a la práctica cualquiera de los métodos de la invención.

### Descripción de los dibujos

**FIG. 1** muestra los resultados BLAST para una porción del epítipo para MAB8293, un anticuerpo frente a VP2 de parvovirus B19, con la secuencia VP1u de parvovirus B19.

35 **FIG. 2** es una SDS-PAGE con tinción con Coomassie de construcciones de VP1u de tipo silvestre y mutantes purificadas solubles. El tipo silvestre y los dos mutantes tienen un nivel de pureza similar.

**FIG. 3** muestra concentraciones ELISA usando construcciones de VP1 de proteína de tipo silvestre y mutante como antígeno de revestimiento. Se probaron los sueros agrupados de ratones que se han inmunizado con diferentes vacunas contra parvovirus B19 a las 5 semanas después del punto temporal de la tercera inmunización. En la clave "mAb" se refiere a un MAB8293 control, "VP1/VP2" y "VP2" se refieren a la composición de los VLP de inmunización, y "MF59" indica el uso del adyuvante en las inmunizaciones.

40 **FIG. 4** muestra un alineamiento de la región única de VP1 de los tres genotipos de parvovirus B19: tipo 1 (SEQ ID NO: 4); tipo 2 (SEQ ID NO: 5); y tipo 3 (SEQ ID NO: 6). El epítipo de reacción cruzada se muestra en negrita con un recuadro alrededor de la zona.

45 **FIG. 5** muestra dos gráficos de las concentraciones ELISA (eje y) de sueros tomados en cinco puntos temporales (eje x) para cuatro grupos (marrón, círculos abiertos - Grupo 4 (0,05  $\mu$ g de VP1 mutante/VP2/MF59); naranja, círculos abiertos - Grupo 5 (0,5  $\mu$ g de mutante VP1/VP2/MF59); rojo oscuro, círculos abiertos - Grupo 6 (5  $\mu$ g de VP1 mutante/VP2/MF59); rojo oscuro Xs- Grupo 12 (5  $\mu$ g VP2/MF59)). **FIG. 5(A)** muestra el gráfico de las concentraciones ELISA usando VP1u (wt) (eje y) de sueros tomados en cinco puntos temporales (eje x) para cuatro grupos. **FIG. 5(B)** muestra el gráfico de las concentraciones ELISA usando VP1u (mt) (eje y) de sueros tomados en cinco puntos temporales (eje x) para cuatro grupos.

50 **FIG. 6** muestra un gráfico de la neutralización porcentual (eje y) de diluciones en serie (eje x) de dos sueros seronegativos (círculos rojos y cuadrados naranjas) y cinco sueros seropositivos (triángulo amarillo, verde, triángulos invertidos, rombos azules, círculos abiertos púrpura, y cuadrados abiertos rosa).

## Descripción de las tablas

**Tabla 1** muestra la correlación, o falta de ella, entre los resultados ELISA y la actividad neutralizadora para las diferentes construcciones de región única de VP1.

5 **Tabla 2** muestra la correlación entre la magnitud de los resultados ELISA y la potencia de la actividad neutralizadora para las diferentes construcciones de región única de VP1.

## Descripción detallada de las formas de realización preferidas

### I. Introducción

10 La presente invención se refiere a polipéptidos de la región única de VP1 de parvovirus mutante donde un epítipo para anticuerpos no neutralizadores de parvovirus se ha mutado para alterar sus propiedades antigénicas, a composiciones relacionadas, y a métodos de uso de tales polipéptidos. En determinadas formas de realización, la región única de VP1 de parvovirus mutante no se une a anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con VP2 de parvovirus.

15 Los primeros informes en la bibliografía han sugerido que la medida de la unión de anticuerpos a la región única de VP1 sería útil para identificar y medir anticuerpos neutralizadores en sueros (Kurtzman, GJ *et al.* *J. Clin. Inv.* 84:1114-1123, (1989), (Palmer P. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* (3):236-238 (1996)). Estudios previos demostraron que la región de VP1 de parvovirus B19 contiene epítipos para los anticuerpos neutralizadores de larga duración que son generados durante la infección natural (Modrow S y Dorsch S. *Pathol Biol* (Paris). 50: 326-331 (2002)) y adicionalmente, que péptidos sintéticos de la región única de VP1 inducen anticuerpos con fuerte capacidad neutralizadora (Saikawa *et al.* *J. Virol.* 67: 3004-3009 (1993)). Sin embargo, estudios más recientes han encontrado de forma inesperada que no hay correlación entre la capacidad neutralizadora de parvovirus B19 y la unión de anticuerpos a la región única de VP1 (Bostic *et al.* *J. Infect. Dis.* 179:619-626 (1999)).

25 La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento del solicitante de que hay un epítipo de reacción cruzada entre VP2 y la región única de VP1 (**Fig. 1**). Los solicitantes hicieron el descubrimiento cuando probaban sueros generados por inmunización con un VLP que contenía sol VP2. Los anticuerpos en tales sueros fueron no neutralizadores al nivel presente en los sueros y capaces de unirse al tipo silvestre pero no al polipéptido de la región única de VP1 mutante. Sin pretender estar limitados por la teoría, los solicitantes creen que este epítipo está probablemente implicado en la unión de anticuerpos principalmente no neutralizadores en suero. La unión de anticuerpos a este epítipo es lo que puede haber contribuido a la señal en ensayos previos mostrada en la técnica que conduce a la falta de correlación entre una muestra de suero que se une a la región única de VP1 y la neutralización de parvovirus B19 en ensayos basados en células. Los solicitantes han demostrado adicionalmente que la alteración de este epítipo da como resultado un polipéptido de la región única de VP1 mutante al cual la unión a anticuerpo está relacionada con la capacidad de neutralización de parvovirus B19. Se entenderá, aunque parece ser una relación entre la unión de anticuerpos no neutralizadores y la reactividad cruzada de VP2 del epítipo descrito en el presente documento, que la presente descripción no está limitada a los polipéptidos de la región única de VP1 mutante que no presentan reacción cruzada con anticuerpos que se unen a VP2.

### II. Definiciones

Tal como se usa en la presente memoria el término “parvovirus” se usa para referirse a miembros de la familia *Parvoviridae* que son patógenos para vertebrados, incluyendo Parvovirus, *Erythrovirus*, *Dependovirus*, *Ambovirus* y *Bocavirus*.

40 El término “epítipo para anticuerpos no neutralizadores” se refiere a un epítipo que principalmente se une, o preferentemente induce, anticuerpos no neutralizadores. Por ejemplo, se considera que un epítipo es un “epítipo para anticuerpos no neutralizadores” incluso si el epítipo también se une a una pequeña población de anticuerpos neutralizadores.

45 Tal como se usa en la presente memoria el término “la secuencia que se extiende desde el aminoácido que está alineado con el aminoácido X hasta el aminoácido que está alineado con el aminoácido Y” abarca el aminoácido X, el aminoácido Y, y cualquiera de los aminoácidos entre X e Y en la secuencia de polipéptido que incluye los aminoácidos X e Y. Un epítipo que incluye tal secuencia también puede abarcar la secuencia flanqueadora en cualquier extremo.

A los efectos de la presente descripción, si un anticuerpo es “neutralizador” o tiene “actividad neutralizadora” se refiere a si el anticuerpo es capaz de prevenir la infección en cultivo celular.

50 “Inmunogenicidad funcional” se refiere a si una vacuna es capaz de inducir anticuerpos que neutralicen virus en cultivo celular o es capaz de inducir una respuesta inmunitaria que proteja animales o seres humanos de la enfermedad.

Una “relación de eficacia” para un tratamiento o una profilaxis, tal como una vacuna o una preparación de anticuerpo, es un parámetro que se relaciona con la eficacia de un tratamiento o profilaxis como se describe más adelante. Por ejemplo, si una vacuna induce anticuerpos que son neutralizadores es una “relación de eficacia” para dicha vacuna si

puede demostrarse que existe una asociación positiva entre la presencia de o concentración de tales anticuerpos neutralizadores y la prevención o alivio de la enfermedad por dicha vacuna.

5 Una “relación de neutralización” para un tratamiento de parvovirus o una profilaxis, tal como una vacuna o preparación de anticuerpos, es un parámetro que relaciona la neutralización de infección por parvovirus en un ensayo basado en células sin que se requiera realmente para probar o ensayar la neutralización medir o determinar el parámetro.

Una “relación de protección” para una profilaxis, tal como una vacuna o preparación de anticuerpos, es un parámetro que relaciona la capacidad de la profilaxis para proteger un sujeto contra la infección, enfermedad o muerte.

Una “relación de potencia” para un tratamiento o profilaxis, tal como una vacuna o preparación de anticuerpos, es un parámetro que relaciona la dosis del tratamiento de la profilaxis requerida para un efecto clínico.

10 Tal como se usa en la presente memoria “eficacia” de un componente de vacuna se refiere a si el componente de vacuna previene la infección, o reduce la intensidad o duración de los síntomas clínicos o signos de infección en un sujeto que ha sido inoculado con el componente de vacuna o en el feto o neonato nacido de una mujer inoculada con el componente de vacuna, o reduce la transmisión de la enfermedad a otros individuos. De igual forma, “eficacia” de un tratamiento se refiere a si el tratamiento es capaz de reducir la intensidad de, o reducir la duración de, o suprimir  
15 totalmente los síntomas clínicos de infección, o eliminar totalmente la infección, o reducir la transmisión de la enfermedad a otros individuos.

### III. Polipéptidos de la región única de VP1 de parvovirus mutante

20 Los polipéptidos de la región única de VP1 de parvovirus mutante descritos antes pueden derivarse de cualquier parvovirus que infecte vertebrados, pero preferiblemente derivan de un género que infecta seres humanos, es decir, *Erythrovirus*, *Dependovirus* o *Bocavirus*. En una forma de realización preferida, el parvovirus es la especie B19 del género *Erythrovirus*. En otra forma de realización preferida, el parvovirus es parvovirus 4 humano.

25 Por consiguiente, dada la diversidad de diferentes parvovirus, como sería fácilmente demostrable por un experto en la técnica, la posición exacta de la mutación en el epítipo no neutralizador en la región única de VP1 de parvovirus dependerá de la secuencia particular de la región única de VP1 de tipo silvestre, que diferirá dependiendo del género específico y posiblemente incluso dependerá de la cepa particular de parvovirus en el género. Así, las mutaciones suficientes para alterar las propiedades antigénicas para el epítipo para anticuerpos no neutralizadores de parvovirus no están en una posición fija de aminoácido, sino más bien en el aminoácido que está alineado con un aminoácido particular de VP1 de parvovirus B19.

30 Aminoácidos que están alineados y el porcentaje de identidad pueden determinarse usando un algoritmo de alineamiento por pares, cada ventana móvil de  $x$  aminoácidos desde el extremo N hasta el extremo C (tal que para un alineamiento que se extiende a  $p$  aminoácidos, donde  $p > x$ , hay  $p-x+1$  de tales ventanas) tiene al menos  $x \cdot y$  aminoácidos alineados idénticos, donde:  $x$  está seleccionado de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200; y está seleccionado de 0,50, 0,60, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,91, 0,92, 0,93, 0,94, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98, 0,99; y si  $x \cdot y$  no es un número entero, entonces se redondea hasta el entero más cercano.

35 El algoritmo de alineamiento por pares preferido es el algoritmo de alineamiento global de Needleman-Wunsch (3), que usa parámetros por defecto (por ejemplo, con penalización por apertura del hueco = 10,0, y con penalización por extensión del hueco = 0,5, usando la matriz de puntuación EBLOSUM62). Este algoritmo está convenientemente implementado en las herramientas del paquete EMBOSS.

40 Las mutaciones pueden ser cualquier tipo de mutación que destruya de forma satisfactoria el epítipo para anticuerpos no neutralizadores de parvovirus. Típicamente, la mutación está en la región que se extiende desde el aminoácido que se alinea con el aminoácido 167 de VP1 de parvovirus B19 hasta el aminoácido que se alinea con el aminoácido 171 de VP1 de parvovirus B19. Los aislados de parvovirus B19 muestran cierto grado natural de variación en esta región. Por ejemplo, un aislado tiene un residuo tirosina en el aminoácido 170 en lugar de un residuo histidina. Otro aislado tiene un residuo leucina como aminoácido 171 en lugar de un residuo triptófano. Algunas formas de realización  
45 excluyen tal variación de origen natural en esta región.

El epítipo puede contener al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco mutaciones. En algunas formas de realización, el epítipo en el polipéptido de la región única de VP1 de parvovirus mutante tiene al menos tres mutaciones que incluyen una mutación en el aminoácido que se alinea con el aminoácido 167 de VP1 de parvovirus B19, una mutación en el aminoácido que se alinea con el aminoácido 170 de VP1 de parvovirus B19, y una mutación en el aminoácido que se alinea con el aminoácido 171 de VP1 de parvovirus B19. En otras formas de  
50 realización, el epítipo tiene al menos dos mutaciones que incluyen una mutación en el aminoácido que se alinea con el aminoácido 170 de VP1 de parvovirus B19 y una mutación en el aminoácido que se alinea con el aminoácido 171 de VP1 de parvovirus B19. Aún en otras formas de realización, el epítipo tiene al menos una mutación en el aminoácido que se alinea con el aminoácido 171 de VP1 de parvovirus B19.

55 En formas de realización preferidas, el epítipo en un polipéptido de la región única de VP1 de parvovirus B19 mutante tiene al menos tres mutaciones que incluyen una mutación en el aminoácido 167 de VP1 de parvovirus B19, el



aminoácido 170 de VP1 de parvovirus B19, y el aminoácido 171 de VP1 de parvovirus B19.

Lo más corrientemente, las mutaciones pueden ser eliminaciones, inserciones y sustituciones, que pueden darse en posiciones contiguas o separadas en la región especificada. Corrientemente, las sustituciones son sustituciones no conservadoras (es decir, sustituciones de un aminoácido por otro con una cadena lateral no relacionada). Los aminoácidos codificados genéticamente se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácidos, es decir, aspartato, glutamato; (2) básicos, es decir, lisina, arginina, histidina; (3) no polares, es decir, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga, es decir, glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina y tirosina. Fenilalanina, triptófano y tirosina a veces se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos. En general, la sustitución de aminoácido simple en estas familias no tiene un efecto importante sobre la actividad biológica y por tanto puede no ser suficiente para eliminar la unión al epítipo como una mutación única (aunque el efecto de cualquier mutación puede ensayarse por ELISA sencillo).

Los polipéptidos de la región única de VP1 de parvovirus mutante descritos antes tienen al menos un 70% de identidad (por ejemplo, 75%, 80%, 85%, 87,5%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o más) con la secuencia de tipo silvestre correspondiente del polipéptido de la región única de VP1. Por ejemplo, cuando el polipéptido de la región única de VP1 mutante deriva de un polipéptido B19, la secuencia de referencia es SEQ ID NO: 1.

Otros polipéptidos de la región única de VP1 de parvovirus mutante comprenden al menos  $n$  aminoácidos consecutivos de la secuencia de tipo silvestre correspondiente de la región única de VP1 donde  $n$  es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, o más). Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C terminal y/o el extremo N terminal de la secuencia de tipo silvestre correspondiente de la región única de VP1. Tales fragmentos incluirán el epítipo para anticuerpos no neutralizadores de parvovirus que se han mutado para alterar sus propiedades antigénicas y al menos un epítipo neutralizador de parvovirus. En determinadas formas de realización, los polipéptidos de la región única de VP1 de parvovirus mutante descritos en el presente documento carecen de al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o de toda la secuencia del extremo C terminal de VP1 que tiene en común con VP2.

### Formas de polipéptidos

Los polipéptidos de la región única de VP1 de parvovirus mutante descritos en el presente documento pueden tener varias formas (por ejemplo, nativa, fusiones, glicosilado, no glicosilado, lipidado, no lipidado, fosforilado, no fosforilado, miristoilado, no miristoilado, monomérico, multimérico, en partículas, desnaturalizado, etc.).

Los polipéptidos de la región única de VP1 de parvovirus mutante descritos en el presente documento pueden proporcionarse en forma aislada (por ejemplo, en un contexto de origen natural tal como sustancialmente purificado o expresado de forma recombinante). Los polipéptidos de la región única de VP1 de parvovirus mutante descritos en el presente documento pueden proporcionarse en forma purificada o sustancialmente purificada, es decir, sustancialmente exentos de otros polipéptidos (por ejemplo, exentos de polipéptidos de origen natural), en particular de polipéptidos de *E. coli* u otras células huésped, y son generalmente al menos aproximadamente 50% puros (en peso), y normalmente al menos aproximadamente 90% puros, es decir, menos de aproximadamente 50%, y más preferiblemente menos de aproximadamente 10% (por ejemplo, 5%) de una composición está constituida de otros polipéptidos expresados. Así, los polipéptidos purificados en las composiciones están separados del organismo completo en el que se expresa la molécula.

Los polipéptidos son polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede estar interrumpido por no aminoácidos. El polímero de aminoácidos también puede estar modificado de forma natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente marcador. Además, están incluidos, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (que incluyen, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.) así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los polipéptidos pueden presentarse como cadenas sencillas o cadenas asociadas.

La invención proporciona polipéptidos de la región única de VP1 de parvovirus mutante que comprenden una secuencia -P-L-Q- o -Q-L-P-, donde -P- es una secuencia de aminoácido de la región única de VP1 de parvovirus mutante como se ha definido antes, -L- es un engarce opcional, y -Q- no es una secuencia como se ha definido antes. Cuando el codón del extremo terminal N de -P- no es ATG, pero este codón no está presente en extremo terminal N de un polipéptido, se traducirá como el aminoácido convencional para dicho codón en lugar de como Met. Cuando este codón está en el extremo terminal N de un polipéptido, sin embargo, se traducirá como Met. Ejemplos de restos -Q- incluyen, aunque sin quedar limitados a los mismos, marcas histidina (es decir, His<sub>n</sub> donde  $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$  o más), una proteína de unión a maltosa, o glutatión-S-transferasa (GST).

#### IV. Composiciones relacionadas con polipéptidos de la región única de VP1 de parvovirus mutante, métodos de preparación y métodos de uso

##### Producción de polipéptidos

5 Los polipéptidos de la región única de VP1 de parvovirus mutante descritos en el presente documento pueden prepararse por diversos medios (por ejemplo, expresión recombinante, purificación de cultivo celular, síntesis química, etc.). Se prefieren proteínas expresadas de forma recombinante. En una forma de realización, la descripción proporciona métodos de preparación de los polipéptidos de la región única de VP1 de parvovirus mutante que comprenden proporcionar una célula huésped que contiene un polipéptido unido operativamente a un promotor operable bajo condiciones mediante las cuales se expresa el polipéptido codificado, y recuperar el polipéptido de la célula huésped, por ejemplo, purificando el mismo de los sobrenadantes de cultivo.

10 La invención también proporciona células huésped que contienen un plásmido que codifica los polipéptidos de la región única de VP1 de parvovirus mutante descrita aquí. El plásmido puede incluir un gen que codifica un marcador, etc. Células huésped preferidas son aquellas que producen un polipéptido de la región única de VP1 de parvovirus mutante con el máximo rendimiento y con un perfil de modificación postraduccion que induce a un sujeto inoculado con una vacuna que contiene el polipéptido a producir el mayor número de aminoácidos neutralizadores de parvovirus.

15 Adicionalmente, la invención proporciona polipéptidos que codifican los polipéptidos de la región única de VP1 de parvovirus mutante descritos en el presente documento. Los polipéptidos pueden prepararse de muchas formas, por ejemplo, por síntesis química (por ejemplo, síntesis con fosforamida de ADN) en todo o en parte, digiriendo ácidos nucleicos más largos usando nucleasas (por ejemplo, enzimas de restricción), uniendo ácidos nucleicos más cortos o nucleótidos (por ejemplo, usando ligadas o polimerasas) a partir de genotecas genómicas o de ADNc, etc.

20 Los polinucleótidos son una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, tales como desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o sus análogos. Los polinucleótidos ilustrativos incluyen, ADN, ARN, híbridos de ADN/ARN y análogos de ADN o ARN, tales como los que contienen estructuras principales modificadas (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos (PNA) o fosforotioatos) o bases modificadas. Así, la invención incluye ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADN, ADNc, ácidos nucleicos recombinantes, ácidos nucleicos ramificados, plásmidos, vectores, sondas, cebadores, etc. Cuando el ácido nucleico de la invención toma la forma de ARN, este puede o no tener una caperuza 5'.

25 Los polinucleótidos de la invención pueden ser parte de un vector, es decir, parte de una construcción de ácido nucleico diseñada para la transducción/transfección de uno o más tipos de células. Vectores pueden ser, por ejemplo, vectores de clonación que están diseñados para aislamiento, propagación y replicación de nucleótidos insertados, vectores de expresión que están diseñados para la expresión de una secuencia nucleotídica en una célula huésped, vectores víricos que están diseñados para obtener la producción de un virus o partícula de tipo virus recombinante, o vectores lanzadera, que comprenden los atributos de más de un tipo de vector.

##### Composiciones inmunogénicas

35 Los polipéptidos de la región única de VP1 de parvovirus mutante descritos en el presente documento y los polinucleótidos que codifican los mismos pueden ser útiles como ingredientes activos (inmunógenos) en composiciones inmunogénicas. Como se ha descrito antes, los solicitantes han descubierto que hay un epítipo para anticuerpos no neutralizadores de parvovirus en la región única de VP1 y que alterar las propiedades antigénicas de este epítipo da como resultado un polipéptido de la región única de VP1 de parvovirus mutante en el que la unión de anticuerpos al polipéptido está relacionada con la capacidad de neutralización del parvovirus. Así, la invención puede proporcionar composiciones inmunogénicas alternativas optimizadas para inducir anticuerpos neutralizadores.

40 Las composiciones inmunogénicas incluirán típicamente componentes además de los antígenos, por ejemplo, estas incluirán típicamente uno o más vehículos, excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

##### Excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables

45 Las composiciones inmunogénicas generalmente incluirán uno o más "excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables" tales como agua, solución salina, glicerol, etanol y similares, solos o combinados. Las composiciones inmunogénicas comprenderán típicamente, además de los componentes citados antes, uno o más "vehículos farmacéuticamente aceptables". Estos incluyen cualquier vehículo que no desencadene por sí mismo la inducción de aminoácidos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Vehículos adecuados son típicamente macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, y agregados lipídicos (tales como gotitas de aceite o liposomas). Tales vehículos son bien conocidos para los expertos en la técnica. Adicionalmente, una sustancia auxiliar, tal como un agente humectante o emulsionante, sustancia tampón de pH y similares, puede estar presente. Una descripción minuciosa de componentes farmacéuticamente aceptables está disponible en Gennaro (2000) Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*. 20th Ed., ISBN: 0683306472.

55 También se pueden usar en las composiciones inmunogénicas de la invención sales farmacéuticamente aceptables,

por ejemplo, sales minerales tales como hidroclouros, hidrobromuros, fosfatos o sulfatos, así como sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos o benzoatos.

Si se desea, los antígenos pueden adsorberse sobre, atraparse en o asociarse de otro modo con liposomas y vehículos en partículas tales como micropartículas o nanopartículas de poli(D,L-lactida co-glicolida) (PLG). Los antígenos pueden conjugarse con una proteína vehículo con el fin de potenciar la inmunogenicidad. Véase Ramsay *et al.* (2001) *Lancet* 357(9251):195-196; Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36; Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-168; Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii; Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567; patente europea 0 477 508; patente de Estados Unidos N°. 5,306,492; documento WO98/42721; *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse *et al.*) ISBN 3805549326, particularmente vol. 10:48-114; Hermanson (1996) *Bioconjugate Techniques* ISBN: 0123423368 o 012342335X.

#### Adyuvantes

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden administrarse en combinación con otros agentes inmunorreguladores. Por ejemplo, una composición inmunogénica de la invención puede incluir un adyuvante. Descripciones minuciosas de adyuvantes para vacunas están disponibles en *Vaccine Design: The Subunit y Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X) y *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volumen 42 de la serie *Methods in Molecular Medicine*). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan. Adyuvantes preferidos incluyen, aunque sin quedar limitados a los mismos, uno o más de los tipos siguientes de adyuvantes descritos a continuación. Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden también estar premezcladas con un adyuvante antes de la administración.

#### **Alumbre**

En una forma de realización, el adyuvante para su uso en la presente invención es alumbre (sulfato de potasio y aluminio  $(\text{AlK}(\text{SO}_4)_2)$ ), o un derivado del alumbre, tal que se forme *in situ* mezclando un antígeno en tampón fosfato con alumbre, seguido de valoración precipitación con una base tal como hidróxido de amonio o hidróxido de sodio.

#### **Ácido retinoico**

En una forma de realización, el adyuvante para su uso en la presente invención es ácido retinoico, la forma oxidada de Vitamina A, con solo función parcial de Vitamina A.

#### **MF59C.1**

En una forma de realización, el adyuvante para su uso en la presente invención es MF59C.1, una emulsión aceite en agua (escualeno) en tampón citrato. MF59C.1 ha mostrado ser un adyuvante efectivo y potenciar la producción de altas concentraciones de aminoácidos neutralizadores contra parvovirus B19 (Ballou *et al.*, *JID*, 187:675-678 (2003)).

#### **Composiciones que contienen minerales**

Composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo, oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. [por ejemplo, véanse los capítulos 8 y 9 de *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.], o mezclas de diferentes compuestos minerales, adoptando los compuestos cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.) y siendo la adsorción preferida. Las composiciones que contienen minerales pueden formularse también como una partícula de sal metálica.

Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" son típicamente sales de oxihidróxido de aluminio, que normalmente son al menos parcialmente cristalinas. El oxihidróxido de aluminio, que puede estar representado por la fórmula  $\text{AlO}(\text{OH})$ , puede distinguirse de otros compuestos de aluminio, tales como hidróxido de aluminio  $\text{Al}(\text{OH})_3$ , por espectroscopía infrarroja (IR), en particular por la presencia de una banda de adsorción a  $1070 \text{ cm}^{-1}$  y una fuerte elevación a  $3090\text{-}3100 \text{ cm}^{-1}$  [capítulo 9 de *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.] El grado de cristalinidad de un adyuvante de hidróxido de aluminio se refleja por la anchura de la banda de difracción a la mitad de la altura (WHH), mostrando las partículas poco cristalinas un mayor ensanchamiento de línea debido a menores tamaños de cristalito. El área de la superficie aumenta a medida que aumenta la WHH, y se ha apreciado que los adyuvantes con mayores valores de WHH tienen mayor capacidad para la adsorción de antígenos. Una morfología fibrosa (por ejemplo, como se aprecia en microfotografías electrónicas de transmisión) es típica para adyuvantes de hidróxido de aluminio. El pH de adyuvantes de hidróxido de aluminio es típicamente aproximadamente 11, es decir, el propio adyuvante tiene una carga superficial positiva a pH fisiológico. Se han descrito capacidades adsorbentes de entre 1,8-2,6 mg proteína por mg de  $\text{Al}^{3+}$  a pH 7,4 para adyuvantes de hidróxido de aluminio.

Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son típicamente hidroxifosfatos de aluminio, que contienen con frecuencia también una pequeña cantidad de sulfato (es decir, hidroxifosfato sulfato de aluminio). Estos pueden obtenerse por precipitación, y las condiciones de reacción y concentraciones durante la precipitación influyen en el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo en la sal. Los hidroxifosfatos tienen generalmente una relación molar

$PO_4/Al$  entre 0,3 y 1,2. Los hidroxifosfatos pueden distinguirse del simple  $AlPO_4$  por la presencia de grupos hidroxilo. Por ejemplo, una banda en el espectro IR a  $3164\text{ cm}^{-1}$ . (por ejemplo, cuando se calientan hasta  $200^\circ\text{C}$ ) indica la presencia de hidroxilos estructurales [capítulo 9 de *Vaccine Design...*(1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.].

- 5 La relación molar de  $PO_4/Al^{3+}$  de un adyuvante de fosfato de aluminio estará generalmente entre 0,3 y 1,2, preferiblemente entre 0,8 y 1,2, y más preferiblemente 0,95+0,1. El fosfato de aluminio será generalmente amorfo, en particular para sales hidroxifosfato. Un adyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una relación molar  $PO_4/Al$  entre 0,84 y 0,92, incluyendo 0,6 mg de  $Al^{3+}/ml$ . El fosfato de aluminio estará en general en forma de partículas (por ejemplo, morfología de placas como se aprecia en microfotografías electrónicas de transmisión). Diámetros típicos de las partículas están en el intervalo de 0,5-20  $\mu\text{m}$  (por ejemplo, aproximadamente 5-10  $\mu\text{m}$ ) después de toda la adsorción de antígeno. Se han descrito capacidades adsorbentes de 0,7-1,5 mg proteína por mg  $Al^{3+}$  a pH 7,4 para adyuvantes de fosfato de aluminio.

- 10 El punto de carga cero (PZC) de fosfato de aluminio está inversamente relacionado con el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo, y este grado de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones de reacción y concentración de reaccionantes usados para preparar la sal por precipitación. El PZC también se altera cambiando la concentración de iones fosfato libres en solución (más fosfato = más PZC ácido) o añadiendo un tampón tal como tampón histidina (hace el PZC más básico). Los fosfatos de aluminio usados de acuerdo con la invención tendrán generalmente un PZC de entre 4,0 y 7,0, más preferiblemente entre 5,0 y 6,5, por ejemplo, aproximadamente 5,7.

- 15 Suspensiones de sales de aluminio usadas para preparar composiciones de la invención pueden contener un tampón (por ejemplo, un fosfato o una histidina o un tampón Tris), pero esto no es siempre necesario. Las suspensiones son preferiblemente estériles y apirógenas. Una suspensión puede incluir iones fosfato acuoso libres, por ejemplo, presentes a una concentración entre 1,0 y 20 mM, preferiblemente entre 5 y 15 mM, y más preferiblemente aproximadamente 10 mM. Las suspensiones pueden también comprender cloruro de sodio.

- 20 En una forma de realización, un componente adyuvante incluye una mezcla tanto de un hidróxido de aluminio y un fosfato de aluminio. En este caso, puede haber más fosfato de aluminio que hidróxido, por ejemplo, una relación en peso de al menos 2:1, por ejemplo, >5:1, >6:1, >7:1, >8:1, >9:1, etc.

- 25 La concentración de  $Al^{3+}$  en una composición para administración a un paciente es preferiblemente menor de 10 mg/ml, por ejemplo, <5 mg/ml, <4 mg/ml, <3 mg/ml, <2 mg/ml, <1 mg/ml, etc. Un intervalo preferido está entre 0,3 y 1 mg/ml. Se prefiere un máximo de <0,85 mg/dosis.

### 30 **Emulsiones oleosas**

- Composiciones de emulsión oleosa adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59™ [Capítulo 10 de *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.] (5% Escualeno, 0,5% TWEEN 80™, y 0,5% SPAN 85™, formulada en partículas submicrométricas usando un microfluidizador). También puede usarse adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA).

- 35 Se conocen diversas emulsiones de aceite en agua adecuadas, y estas incluyen típicamente al menos un aceite y al menos un tensioactivo, siendo el aceite(s) y tensioactivo(s) biodegradables (metabolizables) y biocompatibles. Las gotitas de aceite en la emulsión son generalmente menores de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro y, ventajosamente la emulsión comprende gotitas de aceite con un diámetro submicrométrico, consiguiéndose esos pequeños tamaños con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Se prefieren gotitas con un tamaño menor de 220 nm puesto que estas pueden someterse a esterilización por filtrado.

- 40 La invención puede usarse con aceites tales como los de origen animal (tal como pescado) o vegetal. Fuentes de aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. Pueden usarse aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco y aceite de oliva, el más comúnmente disponible, ejemplificados por aceites de nuez. Puede usarse aceite de jojoba, por ejemplo, obtenido de semillas de jojoba. Aceites de semillas incluyen aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de sésamo y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el más fácilmente asequible, pero también puede usarse el aceite de otros granos de cereal tal como trigo, avena, centeno, arroz, mijo, triticale y similares. Pueden prepararse ésteres de glicerol de y 1,2-propanodiol de ácidos grasos de 6-10 átomos de carbono, aunque no estén presentes de forma natural en aceites de semillas, por hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados comenzando por los aceites de nuez y de semillas. Las grasas y aceites de leche de mamíferos son metabolizables y pueden, por tanto, usarse en la práctica de esta invención. Los procedimientos para separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales son bien conocidos en la técnica. La mayoría de pescados contienen aceites metabolizables que pueden recuperarse fácilmente. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón y aceite de ballena tales como espermaceti ejemplifican varios de los aceites de pescado que pueden usarse en el presente documento. Una serie de aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5 carbonos y se denominan generalmente terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene un terpenoide insaturado ramificado conocido como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil 2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno. Otros aceites

preferidos son los tocoferoles (véase más adelante). Las emulsiones de aceite en agua que comprenden escualeno son particularmente preferidas. Pueden usarse mezclas de aceites.

Los tensioactivos pueden clasificarse por su HLB (equilibrio hidrófilo/lipófilo). Tensioactivos preferidos de la invención tienen un HLB de al menos 10, preferiblemente al menos 15 y, más preferiblemente al menos 16. La invención puede usarse con tensioactivos que incluyen, aunque sin quedar limitados a los mismos: tensioactivos de ésteres de polioxietilen sorbitán (denominados habitualmente como TWEENS™), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), y/o óxido de butileno (BO), comercializados con el nombre comercial DOWFAX™, tales como copolímeros de bloque lineales EO/PO; octoxinolos, que pueden variar en el número de grupos etoxi repetidos (oxi-1,2-etanodilo), siendo de particular interés octoxinol-9 (TRITON X-100™, o t-octilfenoxipolietoxietanol); (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); ésteres grasos de polioxietileno derivados de alcohol laurílico, cetílico, estearílico y oleílico (conocidos como tensioactivos Brij), tales monolauril éter de trietilenglicol (Brij 30); y ésteres de sorbitán (denominados habitualmente SPANs), tales como trioleato de sorbitán (SPAN 85™) y monolaurato de sorbitán. Tensioactivos preferidos para incluir en la emulsión son TWEEN 80™ (monooleato de polioxietilen sorbitán), SPAN 85™ (trioleato de sorbitán), lecitina y TRITON X-100™. Como se ha citado antes, detergentes tales como TWEEN 80™ pueden contribuir a la estabilidad térmica apreciada en los ejemplos siguientes.

Pueden usarse mezclas de tensioactivos, por ejemplo, mezclas de TWEEN 80™/ SPAN 85™. También es adecuada una combinación de éster de polioxietilen sorbitán tal como monooleato de polioxietilen sorbitán (TWEEN 80™) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X-100™). Otra combinación útil comprende laureth 9 más un éster de polioxietilen sorbitán y/o un octoxinol.

Cantidades preferidas de tensioactivos (% en peso) son: ésteres de polioxietilen sorbitán (tales como TWEEN 80™) 0,01 a 1%, en particular aproximadamente 0,1 %; octil- o nonilfenoxi polioxietanoles (tales como TRITON X-100™, u otros detergente en las series Triton) 0,001 a 0,1 %, en particular 0,005 a 0,02%; éteres de polioxietileno (tales como laureth 9) 0,1 a 20 %, preferiblemente 0,1 a 10 % y en particular 0,1 a 1 % o aproximadamente 0,5%.

Adyuvantes de emulsión aceite en agua específicos útiles con la invención incluyen, aunque sin quedar limitados a los mismos:

– Una emulsión submicrométrica de escualeno, TWEEN 80™ y SPAN 85™. La composición de la emulsión en volumen puede ser aproximadamente 5% de escualeno, aproximadamente 0,5% de polisorbato 80 y aproximadamente 0,5% de SPAN 85™. En términos de peso, estas relaciones se hacen 4,3% de escualeno, 0,5% de polisorbato 80 y 0,48% de SPAN 85™. Este adyuvante es conocido como 'MF59™'. La emulsión de MF59™ incluye ventajosamente iones citrato, por ejemplo, tampón citrato de sodio 10 mM.

– Una emulsión que comprende escualeno, un  $\alpha$ -tocoferol y polisorbato 80. Estas emulsiones pueden tener de 2 a 10 de escualeno, de 2 a 10% de tocoferol y de 0,3 a 3% de TWEEN 80™, y la relación en peso de escualeno:tocoferol es preferiblemente <1 (por ejemplo, 0,90) ya que esta proporciona una emulsión más estable. Escualeno y TWEEN 80™ pueden estar presentes en una relación en volumen de aproximadamente 5:2, o en una relación en peso de aproximadamente 11:5. Una emulsión de este tipo puede prepararse disolviendo TWEEN 80™ en PBS para dar una solución al 2%, luego mezclando 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL- $\alpha$ -tocoferol y 5 ml de escualeno), luego microfluidizando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotitas de aceite submicrométricas, por ejemplo, con un diámetro medio de entre 100 y 250 nm, preferiblemente de aproximadamente 180 nm.

– Una emulsión de escualeno, un tocoferol y un detergente Triton (por ejemplo, TRITON X-100™). La emulsión puede incluir también un 3d-MPL (véase más adelante). La emulsión puede contener un tampón fosfato.

– Una emulsión que comprende un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un detergente Triton (por ejemplo, TRITON X-100™) y un tocoferol (por ejemplo, un  $\alpha$ -tocoferol succinato). La emulsión puede incluir estos tres componentes a una relación en masa de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo, 750  $\mu$ g/ml polisorbato 80, 110  $\mu$ g/ml TRITON X-100™ y 100  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -tocoferol succinato), y estas concentraciones incluirán cualquier contribución de estos componentes de antígenos. La emulsión puede también incluir escualeno. La emulsión puede también incluir un 3d-MPL (véase más adelante). La fase acuosa puede contener un tampón fosfato.

– Una emulsión de escualeno, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("PLURONIC L121™"). La emulsión puede formularse en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de administración útil para dipéptidos de muramilo, y se ha usado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" (0,05-1% de Thr-MDP, 5% de escualeno, 2,5% de PLURONIC L121™ y 0,2% polisorbato 80). También puede usarse sin Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" (5% de escualeno, 1,25% de PLURONIC L121™ y 0,2% de polisorbato 80). Se prefiere la microfluidización.

– Una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico hidrófilo de alquil éter de polioxietileno (por ejemplo, cetostearyl éter de polioxietileno (12) y un tensioactivo no iónico hidrófobo (por ejemplo, un éster de sorbitán o éster de mannide, tal como monooleato de sorbitán o 'SPAN 80™'). La emulsión

es preferiblemente termorreversible y/o tiene al menos un 90% de gotitas de aceite (en volumen) con un tamaño menor de 200 nm. La emulsión también puede incluir uno o más de: alditol, un agente crioprotector (por ejemplo, un azúcar tal como dodecilmaltóxido y/o sacarosa); y/o un alquilpoliglicósido. Tales emulsiones pueden estar liofilizadas.

- 5 – Una emulsión que tiene de 0,5-50% de un aceite, 0,1-10% de un fosfolípido y 0,05-5% de un tensioactivo no iónico. Componentes fosfolípidos preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Son ventajosos tamaños de gotita submicrométricos.
- 10 – Una emulsión aceite en agua submicrométrica de un aceite no metabolizable (tal como aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (tal como lecitina, TWEEN 80™ o SPAN 80™). Pueden incluirse aditivos tales como QuilA saponina, colesterol, un conjugado saponina-lipófilo (tal como GPI-0100, producido por adición de amina alifática a desacilsaponina mediante el grupo carboxilo de ácido glucurónico), bromuro de dimetildioctadecilamonio y/o N,N-dioctadecil-N,N-bis (2-hidroxietyl)propanodiamina.
- 15 – Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico, y un tensioactivo hidrófilo no iónico, (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o copolímero de bloque de polioxi-etileno-polioxi-propileno) (véase el documento WO2006/113373).
- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado hidrófilo no iónico, y un tensioactivo lipófilo no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o un copolímero de bloque de polioxi-etileno-polioxi-propileno) (véase el documento WO2006/113373).
- 20 – Una emulsión en la que una saponina (por ejemplo, QuilA o QS21) y un esteroles (por ejemplo, un colesterol) están asociados como micelas helicoidales.

Antígenos y adyuvantes en una composición estarán típicamente mezclados en el momento de la administración a un paciente. Las emulsiones pueden mezclarse con antígeno durante la fabricación, o de forma extemporánea, en el momento de la administración. Así, el adyuvante y antígeno pueden mantenerse separados en una vacuna envasada o distribuida, listos para la formulación final en el momento de uso. El antígeno generalmente estará en una forma acuosa, tal que la vacuna se prepara finalmente mezclando dos líquidos. La relación en volumen de los dos líquidos puede variar (por ejemplo, entre 5:1 y 1:5) aunque generalmente es aproximadamente 1:1.

**Formulaciones de saponina** (véase el capítulo 22 de *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.)

30 También pueden usarse formulaciones de saponina como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterogéneo de glicósidos de esteroles y glicósido de triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces, e incluso flores de una amplia gama de especies vegetales. La saponina de la corteza del árbol *Quillaia saponaria* Molina se ha estudiado ampliamente como adyuvante. La saponina también puede obtenerse comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia), y *Saponaria officinalis* (jabonera). Las formulaciones de adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones de lípidos, tales como ISCOMs. QS21 se comercializa como Stimulon™.

Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones purificadas específicas que usan estas técnicas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferiblemente, la saponina es QS21. Un método de producción de QS21 se describe en el documento US 5,057,540. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esteroles, tal como colesterol.

Pueden usarse combinaciones de saponinas y colesteroles para formar partículas características denominadas complejos inmunoestimuladores (ISCOM) (capítulo 23 de *Vaccine Design...*(1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.). Los ISCOM también incluyen típicamente un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Puede usarse cualquier saponina conocida en los ISCOMs. Preferiblemente, el ISCOM incluye una o más de QuilA, QHA & QHC. Los ISCOM se describen con detalle en el documento WO96/33739. Opcionalmente, los ISCOMS pueden estar exentos de detergente adicional.

#### **Virosomas y partículas semejantes a virus**

También pueden usarse virosomas y partículas semejantes a virus (VLP) como adyuvantes en la invención. Estas estructuras contienen generalmente una o más proteínas de un virus opcionalmente combinadas o formuladas con un fosfolípido. Estos son generalmente no patógenos, no replicantes y generalmente no contienen nada del genoma vírico nativo. Las proteínas víricas pueden producirse de forma recombinante o aislarse de virus completos. Estas proteínas víricas adecuadas para uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (tales como HA o NA), virus de la hepatitis B (tal como las proteínas del núcleo o de la cápsida), virus de la hepatitis E, sarampión, virus Sindbis, Rotavirus, virus de la enfermedad de boca mano pie, Retrovirus, virus de Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q $\beta$  (tal como proteínas de la envuelta), fago GA, fago fr, fago AP205, y Ty (tal como proteína

P1 del retrotransposón Ty).

### Derivados bacterianos o microbianos

Adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), derivados de lípido A, oligonucleótidos inmunoestimuladores y toxinas ADP-ribosilantes y derivados destoxificados de los mismos.

Los derivados no tóxicos de LPS incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MLP 3-O-desacilado (3dMPL). 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3 des-O-acilado con 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Una forma preferida de “partícula pequeña” de monofosforil lípido A 3 des-O-acilado se describe en el documento EP-A-0689454. Dichas “partículas pequeñas” de 3dMPL son suficientemente pequeñas para esterilizarse por filtrado a través de una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  (documento EP-A-0689454). Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen miméticos de monofosforil lípido A, tales como derivados fosfato de aminoalquil glucosaminido, por ejemplo, RC-529.

Los derivados de lípido A incluyen derivados de lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. OM-174 se describe, por ejemplo, en Meraldi *et al.* (2003) *Vaccine* 21:2485-2491 y Pajak *et al.* (2003) *Vaccine* 21:836-842.

Oligonucleótidos inmunoestimuladores adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias nucleotídicas que contienen el motivo CpG (una secuencia de dinucleótidos que contiene una citosina no metilada unida por un enlace fosfato a una guanina). ARN bicatenarios y oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o de poli(dG) también han demostrado ser inmunoestimuladoras.

Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones fosforotioato y pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Referencias Kandimalla *et al.* (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400; los documentos WO02/26757 y WO99/62923 describen posibles sustituciones de análogos, por ejemplo, sustitución de guanina con 2'-desoxi-7-desazaguanina. El efecto adyuvante de oligonucleótidos CpG se describe con más detalle en Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835; McCluskie *et al.* (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185; documentos WO98/40100; US 6,207,646; US 6,239,116; y US 6,429,199.

La secuencia CpG puede estar dirigida a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT (Kandimalla *et al.* (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (parte 3):654-658). La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria Th1, tal como un ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B, tal como un ODN CpG-B. Los ODN CpG-A y CpG-B se describen en Blackwell *et al.* (2003) *J Immunol* 170:4061-4068; Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65 y en el documento WO01/95935. Preferiblemente el CpG es un ODN CpG-A.

Preferiblemente, el oligonucleótido CpG se construye de modo que el extremo 5' esté accesible para el reconocimiento por el receptor. Opcionalmente, pueden unirse dos secuencias oligonucleotídicas CpG en sus extremos 3' para formar “inmunómeros”. Véase, por ejemplo, Kandimalla *et al.* (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (parte 3):654-658 & Kandimalla *et al.* (2003) *BBRC* 306:948-953; Bhagat *et al.* (2003) *BBRC* 300:853-861 y el documento WO03/035836.

Un adyuvante particularmente útil basado en oligonucleótidos inmunoestimuladores se conoce como IC-31<sup>TM</sup> (Schellack *et al.* (2006) *Vaccine* 24:5461-72). Así, un adyuvante usado con la invención puede comprender una mezcla de (i) un oligonucleótido (por ejemplo, entre 15-40 nucleótidos) que incluye al menos un (y preferiblemente varios) motivos Cpl (es decir, una citosina unida a una inosina para formar un dinucleótido), y (ii) un polímero policatiónico, tal como un oligonucleótido (por ejemplo, entre 5-20 aminoácidos) que incluyen al menos una (y preferiblemente varias) secuencias del tripéptido Lys-Arg-Lys. El oligonucleótido puede ser un desoxinucleótido que comprende la secuencia de 26-mer 5'-(IC)<sub>13</sub>-3' (**SEQ ID NO: 2**). El polímero policatiónico puede ser un péptido que comprende la secuencia de aminoácido de 11-mer KLKLLLLLKLK (**SEQ ID NO: 3**).

Toxinas ADP-ribosilantes bacterianas y derivados destoxificados de las mismas pueden usarse como adyuvante en la invención. Preferiblemente, la proteína deriva de *E. coli* (enterotoxina “LT” termolábil de *E.coli*), cólera (“CT”), o pertussis (“PT”). El uso de toxinas ADP-ribosilantes destoxificadas como adyuvantes de la mucosa se describe en el documento WO95/17211 y como adyuvantes parenterales en el documento WO98/42375. La toxina o toxoide está preferiblemente en la forma de una holotoxina, que comprende tanto las subunidades A y B. Preferiblemente, la subunidad A contiene una mutación destoxificante, preferiblemente, la subunidad B no está mutada. Preferiblemente, el adyuvante es un mutante LT destoxificado, tal como LT-K63, LT-R72 y LT-G192. El uso de toxinas ADP-ribosilantes y derivados destoxificados de las mismas, en particular LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes puede encontrarse en Beignon *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019; Pizza *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2534-2541; Pizza *et al.* (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461; Scharton-Kersten *et al.* (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313; Ryan *et al.* (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280; Partidos *et al.* (1999) *Immunol Lett* 67:209-216; Peppoloni *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293; Pine *et al.* (2002) *J Control Release* 85:263-270 y Tebbey *et al.* (2000) *Vaccine* 18:2723-34. Un mutante CT útil es CT-E29H. La referencia numérica para las sustituciones de aminoácidos está preferiblemente basada en los alineamientos de las subunidades A y B de las toxinas ADP-ribosilantes expuestas en Domenighini *et al.* (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.

**Inmunomoduladores humanos**

5 Inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.) (documentos WO99/40936 y WO99/44636), interferones (por ejemplo, interferón- $\gamma$ ), factor estimulador de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral. Un inmunomodulador preferido es IL-12.

**Bioadhesivos y mucoadhesivos**

10 También pueden usarse bioadhesivos y mucoadhesivos como adyuvantes en la invención. Bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificadas (Singh *et al*] (2001) *J Cont Release* 70:267-276) o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. También puede usarse quitosano y derivados del mismo como adyuvantes en la invención (documento WO99/27960).

**Micropartículas**

15 También pueden usarse micropartículas como adyuvantes en la invención. Las micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150  $\mu$ m de diámetro, más preferiblemente ~200 nm a ~30  $\mu$ m de diámetro, y lo más preferiblemente ~500 nm a ~10  $\mu$ m de diámetro) formadas de materiales que son biodegradables y o tóxicos (por ejemplo, un poli( $\alpha$ -hidroxi ácido), un poli(ácido hidroxibutírico), un poliortoéster, a polianhídrido, una policaprolactona, etc.), siendo preferida poli(lactida-co-glicolida), tratada opcionalmente para que tenga una superficie cargada negativamente (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB).

**Liposomas** (Capítulos 13 & 14 de *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.)

20 Ejemplos de formulaciones de liposomas adecuados para su uso como adyuvantes se describen en los documentos US 6,090,406, US 5,916,588 y EP A 0626169.

**Formulaciones de éteres de polioxietileno y éster de polioxietileno**

25 Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno (documento WO 99/52549). Tales formulaciones incluyen además tensioactivos de éster de polioxietilensorbitán en combinación con un octosinol (documento WO 01/21207), así como tensioactivos de alquil éter o éster de polioxietileno en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octosinol (documento WO 01/21152). Los éteres de polioxietileno preferidos están seleccionados del siguiente grupo: éter de polioxietileno-9-laurilo (laureth 9), éter de polioxietileno-9-esteorilo, éter de polioxietileno-8-esteorilo, éter de polioxietileno-4-laurilo, éter de polioxietileno-35-laurilo y éter de polioxietileno-23-laurilo

**Polifosfazenos (PCPP)**

30 Las formulaciones de PCPP se describen, por ejemplo, en Andrianov *et al.* (1998) *Biomaterials* 19:109-115 y Payne *et al.* (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.

**Péptidos de muramilo**

35 Ejemplos de péptidos de muramilo adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetilnormuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilmuramil-L-alanil-Disoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina MTP-PE).

**Compuestos de imidazoquinolona**

40 Ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen Imiquimod y sus homólogos (por ejemplo, "Resiquimod 3M"), descritos con detalle en Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577 y Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.

La invención puede incluir además combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados antes. Por ejemplo, las siguientes composiciones de adyuvantes pueden usarse en la invención: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua (documento WO99/11241); (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) (documento WO94/00153); (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroil) (documento WO98/57659); (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones aceite en agua (solicitudes de patente europea 0835318, 0735898 y 0761231); (6) SAF, que contiene 10% de escualeno, 0,4% de TWEEN 80™, 5% de polímero de bloque pluronic L121, y thr-MDP, bien microfluidizada en emulsión submicrométrica o tratada en vórtice para generar una emulsión de mayor tamaño de partículas; (7) sistema adyuvante RIBI™ (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene 2% de escualeno, 0,2% de TWEEN 80™, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforil lípido A (MLP), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (Detox™); y (8) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (tal como 3dMPL).

50



Otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores se describen en el capítulo 7 de *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum. El uso de adyuvante de hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio es útil, en particular en niños, y los antígenos son adsorbidos generalmente sobre estas sales. También se prefieren emulsiones de escualeno en agua, en particular en ancianos. Combinaciones de adyuvantes útiles incluyen combinaciones de adyuvantes Th1 y Th2 tales como CpG y alumbre o resiquimod y alumbre. Puede usarse una combinación de fosfato de aluminio y 3dMPL.

#### **Vacunas y métodos para generar respuestas inmunitarias**

Las composiciones inmunogénicas pueden ser útiles como vacunas. Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la infección), aunque típicamente serán profilácticas. Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas contienen una cantidad inmunológicamente efectiva de antígeno(s), así como cualquier otro componente(s), según sea necesario. Cantidad inmunológicamente efectiva significa que la administración de dicha cantidad a un sujeto, bien como una dosis única o como parte de una serie, es efectiva para el tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del sujeto a tratar, edad, el grupo taxonómico del individuo a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la valoración del médico encargado de la situación médica y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad estará en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante pruebas de rutina. La invención también proporciona un dispositivo de administración previamente cargado con una composición inmunogénica descrita en el presente documento.

Las composiciones inmunogénicas, polinucleótidos y vacunas descritas en el presente documento pueden usarse en métodos para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto para la protección contra la infección por parvovirus. Los sujetos son vertebrados, preferiblemente un ser humano, aunque también puede ser un ratón, visón aleutiano, res, cánido, pato, mono, chimpancé, gorila, orangután, bonobo, u otro primate. Sujeto humano preferidos incluyen individuos que padecen anemia drepanocítica o cualquier discrasia sanguínea, pacientes trasplantados, hembras en edad fértil, en particular hembras en cinta e individuos que planean someterse a un procedimiento médico que provoque inmunosupresión.

Debido a la similitud entre las regiones únicas de VP1 de diferentes parvovirus, en algunos casos, la composición administrada contiene un polipéptido de la región única de VP1 de parvovirus mutante procedente de un género, especie o cepa de parvovirus capaz de infectar un determinado vertebrado, aunque la composición inmunogénica o vacuna es capaz de provocar una respuesta inmunitaria en un vertebrado diferente hacia el mismo o diferente género, especie o cepa de parvovirus. La protección contra la infección por parvovirus puede proporcionar protección contra determinadas enfermedades incluyendo, aunque sin quedar limitadas a la mismas, quinta enfermedad, hidropesía fetal y crisis aplásica.

Las composiciones inmunogénicas y vacunas descritas antes incluyen antígenos de polipéptidos. En todos los casos, sin embargo, los antígenos de polipéptidos pueden estar reemplazados por polinucleótidos (típicamente ADN) que codifican estos polipéptidos, para proporcionar composiciones, vacunas, métodos y usos basados en la inmunización con ácido nucleico. El ácido nucleico que codifica el inmunógeno es expresado *in vivo* después de la administración y el inmunógeno expresado estimula seguidamente el sistema inmunitario. La inmunización con ácido nucleico es ahora un campo desarrollado.

La invención también proporciona un método para inducir anticuerpos neutralizadores de parvovirus administrando una cantidad efectiva de una composición inmunogénica, polinucleótido o vacuna.

#### **V. Métodos y kits de uso de polipéptidos de la región única de VP1 de parvovirus mutante**

La correlación demostrada en el presente documento entre la unión de anticuerpos a los polipéptidos de la región única de VP1 de parvovirus mutante y la capacidad de neutralización de parvovirus hace estos polipéptidos útiles para cualquier método que requiera la capacidad de estimar de forma selectiva la concentración de anticuerpos neutralizadores.

#### **Evaluación de la inmunogenicidad de componentes de vacunas contra parvovirus**

En determinadas formas de realización, la invención se refiere a métodos para evaluar la inmunogenicidad funcional de un componente de vacuna contra parvovirus proporcionando una preparación de anticuerpos de un sujeto inoculado con un componente de vacuna contra parvovirus poniendo en contacto la preparación de anticuerpos con un polipéptido de la región única de VP1 mutante descrito en el presente documento y evaluando la inmunogenicidad funcional de un componente de vacuna contra parvovirus detectando si la preparación de anticuerpos se une al polipéptido.

Vacunas adecuadas que pueden ensayarse usando los métodos y composiciones descritas en el presente documento incluyen cualquier material que produzca una respuesta inmunitaria humoral a parvovirus. Vacunas adecuadas ensayadas pueden incluir antígenos en el contexto de parvovirus vivos, atenuados o inactivados. Los componentes de la vacuna pueden ser una proteína, un proteoglicano, una lipoproteína, una vesícula de membrana externa, una

partícula semejante a un virus o una vacuna completa. Típicamente, la vacuna a ensayar incluye la región única de VP1 como componente y en algunas formas de realización, los polipéptidos de la región única de VP1 mutante descritos en el presente documento.

5 Para vacunas que comprenden polipéptidos que expresan antígeno, un experto en la técnica reconocería que la preparación de anticuerpos a usar para evaluar la inmunogenicidad funcional se une al antígeno codificado en lugar de al polipéptido.

10 Los métodos y composiciones descritos en el presente documento pueden usarse para determinar la inmunogenicidad funcional de vacunas para cualquier uso, incluyendo, pero sin estar limitadas a, ensayos clínicos, para evaluar la fabricación de una vacuna para verificar que cada lote fabricado demuestra la inmunogenicidad funcional requerida, para evaluar la inmunogenicidad funcional después de la administración a sujetos específicos, y para evaluar la inmunogenicidad funcional contra una cepa particular de parvovirus usando una región única de VP1 de parvovirus mutante de dicha cepa.

### Otros métodos

15 En algunas formas de realización, la descripción se refiere a métodos para identificar sujetos que pueden estar en riesgo de infección por parvovirus que comprende proporcionar una preparación de anticuerpos de un sujeto que puede estar en riesgo de infección por parvovirus; poner en contacto la preparación de anticuerpos con un polipéptido de la región única de VP1 mutante descrito en el presente documento; e identificar sujetos que pueden estar en riesgo de infección por parvovirus detectando si la preparación de anticuerpos se une al polipéptido. Típicamente, el sujeto puede estar en riesgo de infección debido a que el sujeto se ha expuesto a parvovirus o puede haber estado en un entorno que probablemente contenga parvovirus, tal como uno con un gran número de niños.

20 En otras formas de realización, la invención se refiere a métodos para determinar si una preparación de anticuerpos es probable que contenga anticuerpos neutralizadores de parvovirus que comprende proporcionar una preparación de anticuerpos; poner en contacto la preparación de anticuerpos con un polipéptido de la región única de VP1 mutante descrito en el presente documento; y determinar si una preparación de anticuerpos es probable que contenga anticuerpos neutralizadores de parvovirus detectando si la preparación de anticuerpos se une al polipéptido aislado. La invención puede usarse para determinar la potencia de la preparación de anticuerpos.

30 Los polipéptidos de la región única de VP1 mutante descritos en el presente documento pueden usarse en métodos como un diagnóstico general para productos sanguíneos. La preparación de anticuerpos a probar puede ser un concentrado de inmunoglobulinas (IV-IG), que se usa como un tratamiento terapéutico para infección por parvovirus B19. De forma alternativa, la preparación de anticuerpos procede de un sujeto que ha estado expuesto a parvovirus, se ha tratado para una infección por parvovirus, o se ha vacunado contra parvovirus.

35 Aún en otras formas de realización, la invención se refiere a métodos para medir una relación de eficacia para evaluar el tratamiento para infección por parvovirus que comprende proporcionar una preparación de anticuerpos de un sujeto que ha recibido el tratamiento para infección por parvovirus; y medir una relación de eficacia para evaluar el tratamiento para la infección por parvovirus detectando si la preparación de anticuerpos se une al polipéptido aislado. Típicamente, el tratamiento para la infección por parvovirus a evaluar es la administración de un concentrado de inmunoglobulinas.

### Preparaciones de anticuerpos

40 Las preparaciones de anticuerpos usadas en los métodos descritos en el presente documento pueden obtenerse de cualquier fuente con tal que la unión del anticuerpo con los polipéptidos de la región única de VP1 de parvovirus mutante descrito en el presente documento puedan relacionarse con su capacidad neutralizadora. En determinadas formas de realización, la preparación de anticuerpos puede estar en la forma de una muestra de suero que contiene anticuerpos, anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados con antígeno o anticuerpos monoclonales.

45 En formas de realización en las que la preparación de anticuerpos se va a usar para evaluar la inmunogenicidad funcional de un componente de vacuna contra parvovirus, para identificar sujetos que pueden estar en riesgo de infección por parvovirus, o para medir una relación de eficacia para evaluar el tratamiento para una infección por parvovirus, se toma una muestra, respectivamente de un sujeto que se inocula con la vacuna, que puede estar en riesgo de infección, o que ha recibido tratamiento.

50 En otras formas de realización, la preparación de anticuerpos en sí es un tratamiento para infección por parvovirus, tal como un concentrado de inmunoglobulinas, que se ensaya antes de la administración con el fin de determinar si hay presentes anticuerpos neutralizadores, la concentración de anticuerpos presentes y la potencia de la preparación.

### Ensayos para la detección de la unión

55 Con el fin de poner en práctica los métodos descritos en el presente documento, la capacidad de una preparación de anticuerpos para unirse al polipéptido de la región única de VP1 mutante se detecta usando cualquier técnica disponible para un experto en la técnica para la detección de la unión a anticuerpos. A modo de ejemplo, métodos de detección incluyen transferencia Western, ELISA, ensayo de flujo lateral, aglutinación con látex, tiras

inmunocromatográficas, fluorescencia (incluyendo métodos de detección por fluorescencia por citometría de flujo multicanal), nefelometría de velocidad, e inmunoprecipitación.

5 En determinadas formas de realización, el polipéptido de la región única de VP1 de parvovirus mutante puede estar fijado a un soporte sólido tal como una placa multipocillos tal como una placa de 96 o de 384 pocillos, perlas, esferas, membrana, metal coloidal (por ejemplo, oro), elemento poroso, superficies de capilaridad (por ejemplo, en pruebas de flujo a través), tiras de prueba o partículas de látex. El polipéptido de la región única de VP1 de parvovirus mutante puede estar fijado a un soporte sólido bien directamente o por unión indirecta tal como un anticuerpo de captura como se usa en una prueba ELISA tipo sandwich. Ejemplos de uniones directas a un soporte incluyen unión covalente, unión no covalente, o adsorción a una superficie del soporte o en el soporte en el caso de un soporte de gel tal como agarosa o acrilamida.

10 Cuando se usa detección basada en ELISA, puede usarse cualquier enzima ensayable adecuada incluyendo, a modo de ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa y acetilcolinesterasa.

Un experto en la técnica puede seleccionar cualquier sustrato adecuado para la enzima elegida tal como un sustrato cromogénico, radiomarcado o fluorescente.

15 Cuando se ponen en práctica los métodos descritos en el presente documento, la evaluación a conseguir por el método puede determinarse por cualquier método adecuado para el análisis de los resultados del ensayo de unión a anticuerpo particular que puede relacionarse con el parámetro a medir. En una forma de realización ejemplo relativa a un método para evaluar la inmunogenicidad funcional de un componente de vacuna contra parvovirus, el ensayo puede producir un resultado binario tal como un ensayo de aglutinación con látex que se adapta de modo tal que no se produce agregación cuando una vacuna no es funcionalmente inmunogénica contra un patógeno mientras que se produce agregación cuando la vacuna es funcionalmente inmunogénica. En otras formas de realización, el análisis producirá un valor numérico de modo que un valor por encima o por debajo de un umbral indica inmunogenicidad funcional. Métodos de análisis preferidos con resultados numéricos incluyen el método del  $\%B_{max}$ , y la relación señal-ruido (S/N) en la que la señal de la muestra de patógeno se divide por la señal del blanco. Para los métodos con resultado numérico una forma de realización preferida incluiría una curva patrón obtenida con concentraciones diferentes de preparaciones de anticuerpos de referencia y probar varias diluciones diferentes del polipéptido de la región única de VP1 de parvovirus mutante.

### Kits

30 Los métodos y composiciones descritos en el presente documento pueden realizarse en un kit para la práctica de los ensayos. En un aspecto, los kits para su uso en métodos y composiciones que se describen en el presente documento incluirán polipéptidos de la región única de VP1 de parvovirus mutante unidos a un resto de detección.

### VI. Generalidades

35 “Aislado” significa alterado “por el hombre” de su estado natural, es decir, si existe en la naturaleza, se ha cambiado o extraído de su entorno original, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido de origen natural presente en un organismo vivo no está “aislado”, pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural está “aislado”, tal como se emplea el término en el presente documento. Además, un polinucleótido o polipéptido que se introduce en un organismo por transformación, manipulación genética o por cualquier otro método recombinante está “aislado” incluso si está aún presente en dicho organismo siempre que el polipéptido o polinucleótido sea distinguible del polinucleótido o polipéptido endógeno en el organismo, dicho organismo puede ser vivo o no vivo.

40 El término “que comprende” abarca “que incluye” así como “que consiste”, por ejemplo, una composición “que comprende” X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

El término “aproximadamente” en relación a un valor numérico x significa, por ejemplo,  $x \pm 10\%$ .

### VII. Ejemplos

45 Este ejemplo ilustra que la medición de la unión de anticuerpos a un polipéptido de la región única de VP1 de parvovirus mutante que tiene un epítipo mutado para anticuerpos no neutralizadores puede usarse para determinar si una preparación de anticuerpos es probable que contenga anticuerpos neutralizadores de parvovirus.

50 Para evaluar si la región única de VP1 puede usarse para determinar si una preparación de anticuerpos es probable que contenga anticuerpos neutralizadores de parvovirus, se generó un polipéptido de la región única de VP1 B19 basado en la secuencia silvestre (“VP1u wt”). El polipéptido se probó en un ensayo ELISA para la unión a sueros de ratón inoculado con VLP de parvovirus B19 (formado por VP1 y VP2 juntos). Los sueros mostraron previamente que contenían anticuerpos neutralizadores por un ensayo de neutralización basado en células que dio una alta concentración en ELISA, y la mayoría de los sueros que carecían de anticuerpos neutralizadores tuvieron una alta concentración en ELISA. Sin embargo, también se observó cierta unión a VP1u wt para sueros no neutralizadores. 55 Así, no hubo una correlación clara entre la unión en sueros al polipéptido de la región única de VP1 completo y la

capacidad de los sueros para neutralizar parvovirus.

Los sueros no neutralizadores que se unieron a VP1u wt se obtuvieron de ratones inoculados con VLP que contenían solo VP2 que, por tanto, nunca se habían expuesto a la secuencia de VP1u wt. Esto condujo a los autores de la invención a formular la hipótesis de que la región única de VP1 contenía un epítipo VP2. Para probar esta hipótesis, se probó MAB8293 (Millipore), un anticuerpo monoclonal con un epítipo VP2 conocido de PYHHW (**SEQ ID NO: 7**), por ELISA para determinar la unión a VP1u wt. MAB8293 se unió a VP1u wt, confirmando que la región única de VP1 contenía un epítipo VP2. El análisis de secuencia mostró la región de similitud entre la región VP1u que se extiende desde el aminoácido 167 hasta el aminoácido 171 de VP1 de parvovirus B19 (PYTHW (**SEQ ID NO: 8**)) y el epítipo VP2 (PYHHW (**SEQ ID NO: 7**)) (**Fig. 1**).

Se probaron por ELISA dos proteínas mutantes eliminando esta región de similitud AATAA mutante y un mutante AYTA A más conservador (**Fig. 2**), para confirmar que el anticuerpo monoclonal de VP2 MAB8294 ya no se unía. Los resultados mostraron que cualquier mutación eliminaba la unión de MAB8294 en el ELISA (**Fig. 3, Tabla 1**).

Los sueros de ratón que reaccionaron con VP1u wt pero carecían de actividad neutralizadora como se midió por un ensayo de neutralización basado en células (dosis de 5 µg VP2 solo + MF59™ y dosis de 0,05 µg VLP de Parvo) se probaron en un ELISA con las proteínas VP1u mutantes (AATAA y AYTA A). Los sueros de ratón no neutralizadores no reaccionaron con la proteína VP1u mutante pero todavía reaccionaba con la proteína VP1u wt (**Fig. 3**). Esto confirmó que algunos anticuerpos podrían generarse para el epítipo de tipo silvestre (bien en contexto de VP2 o VP1u) pero son no neutralizadores.

La **Tabla 1** es una tabla de resultados ELISA para diferentes construcciones de VP1u. El grupo 4 es el punto temporal 5wp3 de la dosis de 0,05 µg de mutVP1/VP2/MF59™; El grupo 6 es el punto temporal 5wp3 de la dosis de 5,0 µg de mutVP1/VP2/MF59™; El grupo 12 es el punto temporal 5wp3 de la dosis de 5,0 µg de VP2/MF59™; mAb es el anticuerpo monoclonal MAB8293 (Millipore). “Np” significa no probado y el punto temporal 5wp3 se refiere a 5 semanas después de la tercera inmunización. Para esta serie de experimentos el mutVP1 representa una mutación característica de cualquiera de las descritas antes que elimina la actividad PLA<sub>2</sub> de VP1.

Muestra	Vacuna			Concentración de IgG <sup>a</sup>			Actividad neutralizadora
	Antígeno	Dosis (mg)	Adyuvante	VP1u wt	Vp1u AT mut	VP1u YT mut	
mAb				4670	<25	<25	np <sup>b</sup>
Grupo 4	Mut VP1/VP2	0,05	MF59™	1360	<25	<25	no
Grupo 6	Mut VP1/VP2	5	MF59™	4760	<b>2760</b>	<b>1350</b>	<b>si</b>
Grupo 12	VP2	5	MF59™	2360	<25	<25	no

La Figura 5 muestra las concentraciones ELISA de muestras de los tres grupos mostrados en la Tabla 1, así como un cuarto grupo (Grupo 5) obtenidas a las 21 días, 42 días, 56 días, 77 días y 119 días. Las muestras tomadas los días 56 y 77 también se ensayaron para su potencial de neutralización. Las muestras de sueros de los grupos 4 y 12 fueron negativas en el ensayo de neutralización para ambos puntos temporales. Las muestras de sueros de los grupos 5 y 6 fueron positivas en el ensayo de neutralización. Como puede apreciarse en la Figura 5(B), las concentraciones ELISA que usan el mutante (AT) Vp1u muestran una fuerte correlación con la capacidad de neutralización de los sueros y, por tanto, la capacidad de los mutantes VP1u para usarse en la evaluación de la inmunogenicidad funcional de una vacuna candidata o composición inmunogénica. Al contrario, como puede apreciarse en la Figura 5(A), las concentraciones ELISA que usan VP1u tipo silvestre muestran baja correlación puesto que los cuatro grupos producen todos una respuesta de IgG en el orden de magnitud en cada punto temporal a pesar de que dos de los grupos son seronegativos como se mide en el ensayo de neutralización.

La **Tabla 2** es otra tabla de resultados ELISA para diferentes construcciones de VP1u. Como antes, para esta serie de experimentos el mutVP1 representa una mutación característica de cualquiera de las descritas antes que elimina la actividad PLA<sub>2</sub> de VP1. La Figura 6 muestra la neutralización porcentual de las diluciones en serie de los siete grupos mostrados en la Tabla 2 siguiente. La Tabla 2 y la Figura 6 confirman que el ensayo ELISA que usa la construcción VP1u puede diferenciar entre resultados seropositivos y seronegativos. Además, como puede apreciarse con el grupo 5 seropositivo, el ensayo ELISA puede diferenciar entre una fuerte respuesta neutralizadora y respuestas neutralizadores débiles.

Resultados ELISA	Número de grupo (seropositivo o seronegativo)						
	1 (-)	2 (-)	1 (+)	2 (+)	3 (+)	4 (+)	5 (+)
VP1u (wt)	-	-	+++	+++	+++	+++	+
VP1u (mt)	-	-	+++	+++	+++	+++	+

Materiales y métodos

5 El ensayo de neutralización basado en células de parvovirus B19 empleado es un ensayo basado en qRT-PCR que usa parvovirus B19 vivo (genotipo 1) como células progenitoras de entrada y eritroides como sustrato. En resumen, se diferencian células progenitoras eritroides de monocitos de sangre periférica humana como se describe en la bibliografía (Filippone, C. PLoS One. 5:e9496(2010)). Estas células se infectaron con virus o virus que se había incubado previamente con sueros durante una hora a 4°C. Después de la incubación a 37°C durante 48 horas, se extrajo ARN y se llevó a cabo la qRT-PCR con cebadores dirigidos a una variante de corte y empalme que solo está presente en células infectadas y no en el virus de entrada original.

10 Se generaron construcciones de la región única de VP1 con marcas 6xHis en el extremo terminal C para permitir una rápida purificación. En resumen, se diseñaron plásmidos de expresión para expresar de forma inducible la región única de VP1 en células de *E. coli*. Después de la expresión, las células se disgregaron con sonicación y el líquido sobrenadante celular se aplicó a una columna de níquel. Debido a los altos niveles de expresión, una única etapa de purificación conduce a una proteína con >90% de pureza que puede dializarse en un tampón final para su almacenamiento a 4°C.

15 El ELISA de la construcción de la región única de VP1 se llevó a cabo usando técnicas convencionales. Se revistieron placas de 96 pocillos de fondo plano (placas "ELISA") con la construcción de proteína relevante. Después de una etapa de bloqueo, se aplicaron muestras de suero diluido de diferentes estudios a la placa junto con el patrón. Después de incubar durante un tiempo optimizado, se añadió un anticuerpo de detección, seguido por un sustrato apropiado. Las placas se midieron entonces a una DO450 y se interpretaron los datos.

**SECUENCIAS**

SEQ ID NO: 1 Región única de VP1 de parvovirus B19

MSKKS<sup>G</sup>KW<sup>W</sup>ESDDKFAKAVYQ<sup>Q</sup>FVEFYEKV<sup>T</sup>GTDL<sup>E</sup>LIQ<sup>I</sup>LKDHYNISLDNPLEN<sup>P</sup>SSLF  
DLVARIKNNLKNSPDLYSHHFQSHGQLSDH<sup>P</sup>HALSSSSSHAEP<sup>R</sup>GENAVL<sup>S</sup>SEDLHKPGQ  
VSVQLPGTNYVGP<sup>G</sup>NELQAGPPQSAV<sup>D</sup>SAARIHDFRYSQLAKLGINPY<sup>T</sup>HWTVADEEL<sup>L</sup>LK  
NIKNETGFQAQVVKDYFTLKGAAAPVAHFQ<sup>G</sup>SLPEVPAYNASEKY<sup>P</sup>S

SEQ ID NO: 2: Desoxirribonucleótido

25 5'-(IC)<sub>13</sub>-3'

SEQ ID NO: 3: Secuencia de aminoácido

KLKLLLLLKLK

SEQ ID NO: 4 Región única de VP1 de parvovirus B19 (Tipo 1)

MSKESGK<sup>W</sup>ESDDKFAKAVYQ<sup>Q</sup>LVEFYEKV<sup>T</sup>GTDL<sup>E</sup>LIQ<sup>I</sup>LKDHYNISLDNPLEN<sup>P</sup>SSLF 60  
DLVARIKNNLKNSPDLYSHHFQSHGQLSDH<sup>P</sup>HALSSSSSHAEP<sup>R</sup>GENAVL<sup>S</sup>SEDLHKPGQ 120  
VSVQLPGTNYVGP<sup>G</sup>NELQAGPPQSAV<sup>D</sup>SAARIHDFRYSQLAKLGINPY<sup>T</sup>HWTVADEEL<sup>L</sup>LK 180  
NIKNETGFQAQVVKDYFTLKGAAAPVAHFQ<sup>G</sup>SLPEVPAYNASEKY<sup>P</sup>S 227

30 SEQ ID NO: 5 Región única de VP1 de parvovirus B19 (Tipo 2)

MSKESGK<sup>W</sup>ESDDKFAKDVYKQ<sup>F</sup>VVEFYEKV<sup>T</sup>GTDL<sup>E</sup>LIQ<sup>I</sup>LKDHYNISLDNPLEN<sup>P</sup>SSLF 60  
DLVARIKSNLKNSPDLYSHHFQSHGQLSDH<sup>P</sup>HALSPSSSHTEP<sup>R</sup>GENAVL<sup>S</sup>SEDLHKPGQ 120  
VSIQLPGTNYVGP<sup>G</sup>YELQAGPPQSAV<sup>D</sup>SAARIHDFRYSQLAKLGINPY<sup>T</sup>YWTVADEEL<sup>L</sup>LK 180  
NIKNESGFQAQAVKDYFTLKGAAAPVAHFQ<sup>G</sup>SLPEVPAYNASEKY<sup>P</sup>S 227

SEQ ID NO: 6 Región única de VP1 de parvovirus B19 (Tipo 3)

MSKTTDKWESSDKFAQDVYKQFVQFYEKATGTDLELIQILKDHYNISLDNPLENPSSLF 60  
 DLVARIKSNLKNPDLYSHHFQSHGQLSDHPHALSPSNSSTEPARGENAVLSSDLHKPGQ 120  
 VSIQLPGTNYVGPNGELQAGPPQNAVDSAARIHDFRYSQLAKLGINPYTHWTVADEELLK 180  
 NIKNETGFOAQAVKDYFTLKGAAAPVAHFQGSLEVPAYNASEKYPS 227

**Listado de secuencias**

- <110> Novartis AG Settembre, Ethan Chandramouli, Sumana Schaefer, Mary
  - 5 <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EVALUAR LA INMUNOGENICIDAD FUNCIONAL DE VACUNAS CONTRA PARVOVIRUS
  - <130> PAT054720-WO-PCT
  - <140>
  - <141> 2012-07-25
  - 10 <150> US 61/583,116
  - <151> 2011-01-04
  - <150> US 61/511,211
  - <151> 2011-07-25
  - <160> 8
  - 15 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
  - <210> 1
  - <211> 227
  - <212> PRT
  - <213> Parvovirus B19
  - 20 <400> 1
- |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ser | Lys | Lys | Ser | Gly | Lys | Trp | Trp | Glu | Ser | Asp | Asp | Lys | Phe | Ala |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| 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 |
|     |     |     | 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 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 225 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
- <210> 2
  - <211> 26
  - <212> ADN
  - 25 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

<220>  
 <221> característica\_misc  
 5 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25  
 <223> n = inosina

<400> 2  
 ncnncnncnc ncnncnncnc ncnncnc 26

<210> 3  
 10 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Construcción sintética

15 <400> 3  
 Lys Leu Lys Leu Leu Leu Leu Lys Leu Lys  
 1 5 10

<210> 4  
 <211> 227  
 <212> PRT  
 20 <213> Parvovirus B19

<400> 4  
 Met Ser Lys Glu Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala  
 1 5 10 15  
 Lys Ala Val Tyr Gln Gln Leu 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  
 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  
 225

<210> 5  
 <211> 227  
 25 <212> PRT  
 <213> Parvovirus B19

<400> 5

ES 2 687 129 T3

Met Ser Lys Glu Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala  
 1 5 10 15  
 Lys Asp Val Tyr Lys 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 Ser Asn Leu Lys Asp 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 Pro  
 85 90 95  
 Ser Ser Ser His Thr Glu Pro Arg Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser  
 100 105 110  
 Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Gln Val Ser Ile Gln Leu Pro Gly Thr  
 115 120 125  
 Asn Tyr Val Gly Pro Gly Tyr 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 Tyr Trp Thr Val Ala Asp Glu  
 165 170 175  
 Glu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn Glu Ser 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 Glu Val Pro Ala Tyr Asn Ala Ser Glu Lys  
 210 215 220  
 Tyr Pro Ser  
 225

<210> 6

<211> 227

<212> PRT

5 <213> Parvovirus B19

<400> 6

Met Ser Lys Thr Thr Asp Lys Trp Trp Glu Ser Ser Asp Lys Phe Ala  
 1 5 10 15  
 Gln Asp Val Tyr Lys Gln Phe Val Gln Phe Tyr Glu Lys Ala 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 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 Pro  
 85 90 95  
 Ser Asn Ser Ser Thr Glu Pro Arg Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser  
 100 105 110  
 Glu 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 Glu 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 Glu  
 165 170 175  
 Glu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn Glu 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 Glu Val Pro Ala Tyr Asn Ala Ser Glu Lys  
 210 215 220  
 Tyr Pro Ser  
 225

10 <210> 7

<211> 5



<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Construcción sintética

5 <400> 7  
Pro Tyr Thr His Trp  
1 5

<210> 8  
<211> 5  
<212> PRT

10 <213> Parvovirus B19

<400> 8  
Pro Tyr His His Trp  
1 5

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende una región única de VP1 de parvovirus mutante donde un epítipo que incluye la secuencia que se extiende desde el aminoácido que está alineado con el aminoácido 167 de VP1 de parvovirus B19 hasta el aminoácido que está alineado con el aminoácido 171 de VP1 de parvovirus B19 se ha mutado para alterar sus propiedades antigénicas, donde la región única de VP1 de parvovirus mutante tiene al menos un 80% de identidad con la secuencia de tipo silvestre correspondiente de la región única de VP1 o comprende al menos 40 aminoácidos consecutivos de la secuencia de tipo silvestre correspondiente de la región única de VP1, donde la región única de VP1 de parvovirus mutante no presenta reacción cruzada con anticuerpos que se unen a VP2 de parvovirus, y donde el polipéptido es capaz de inducir anticuerpos neutralizadores de parvovirus.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, donde el parvovirus es un miembro de un género seleccionado del grupo que consiste en *Erythrovirus*, *Dependovirus* y *Bocavirus*.
3. El polipéptido de la reivindicación 1, donde el parvovirus es B19.
4. Una composición inmunogénica que comprende el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
5. Un polinucleótido que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
6. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de la reivindicación 4 o el polinucleótido de la reivindicación 5, opcionalmente donde la vacuna comprende además un adyuvante y opcionalmente donde el adyuvante es una emulsión submicrométrica que comprende escualeno y polisorbato 80.
7. Una célula huésped que comprende un plásmido que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
8. Un método para evaluar la inmunogenicidad funcional de un componente de vacuna contra parvovirus que comprende:
- (i) proporcionar una preparación de anticuerpos de un sujeto inoculado con un componente de vacuna contra parvovirus;
- (ii) poner en contacto la preparación de anticuerpos con el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3; y
- (iii) evaluar la inmunogenicidad funcional de un componente de vacuna contra parvovirus detectando si la preparación de anticuerpos se une al polipéptido, opcionalmente donde el componente de vacuna contra parvovirus es una proteína, un proteoglicano, una lipoproteína, una vesícula de membrana externa, una partícula semejante a un virus, o un virus entero.
9. Un método para determinar la potencia de una preparación de anticuerpos contra parvovirus, donde el método comprende:
- (i) proporcionar una preparación de anticuerpos;
- (ii) poner en contacto la preparación de anticuerpos con el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3; y
- (iii) evaluar la potencia detectando si la preparación de anticuerpos se une al polipéptido, opcionalmente donde la preparación de anticuerpos es un concentrado de inmunoglobulinas.
10. El método de la reivindicación 9, que comprende además ajustar una dosis de la preparación de anticuerpos usando la potencia evaluada.
11. Un método para medir una relación de actividad de neutralización para evaluar una profilaxis o un tratamiento para infección por parvovirus que comprende:
- (i) proporcionar una preparación de anticuerpos de un sujeto que ha recibido la profilaxis o el tratamiento para infección por parvovirus;
- (ii) poner en contacto la preparación de anticuerpos con el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3; y
- (iii) medir una relación de la actividad de neutralización para evaluar la profilaxis o el tratamiento para infección por parvovirus detectando si la preparación de anticuerpos se une al polipéptido, opcionalmente donde el tratamiento para infección por parvovirus es la administración de un concentrado de inmunoglobulinas y opcionalmente donde la profilaxis para infección por parvovirus es la administración de una vacuna contra parvovirus.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, donde la detección se lleva a cabo con un ensayo ELISA, un radioinmunoensayo, un inmunoensayo fluorométrico, un ensayo de aglutinación con látex, por ejemplo, donde la detección se realiza con un ensayo ELISA y la enzima del ensayo ELISA está seleccionada del grupo que consiste en

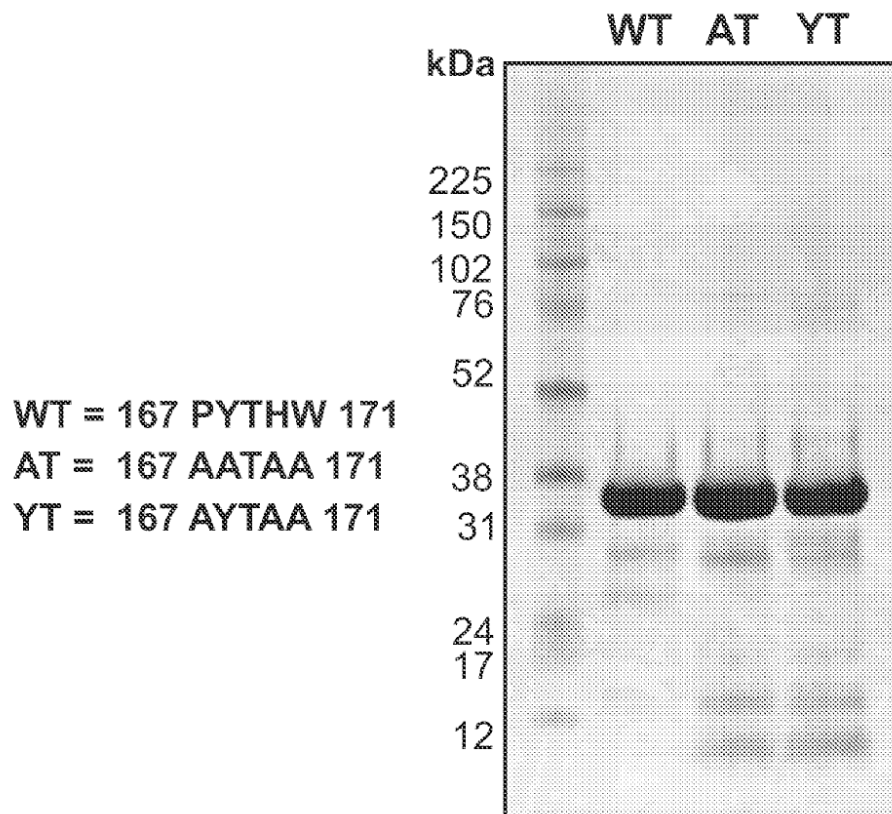
peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa y acetilcolinesterasa, opcionalmente, donde el ensayo ELISA usa un sustrato cromogénico, radiomarcado o fluorescente.

- 5 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8-12, donde la preparación de anticuerpos está seleccionada del grupo que consiste en una muestra de suero que comprende anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados con antígeno y una combinación de dos o más de los anteriores.
14. Un kit para llevar a la práctica el método de una cualquiera de las reivindicaciones 8-13 que comprende un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

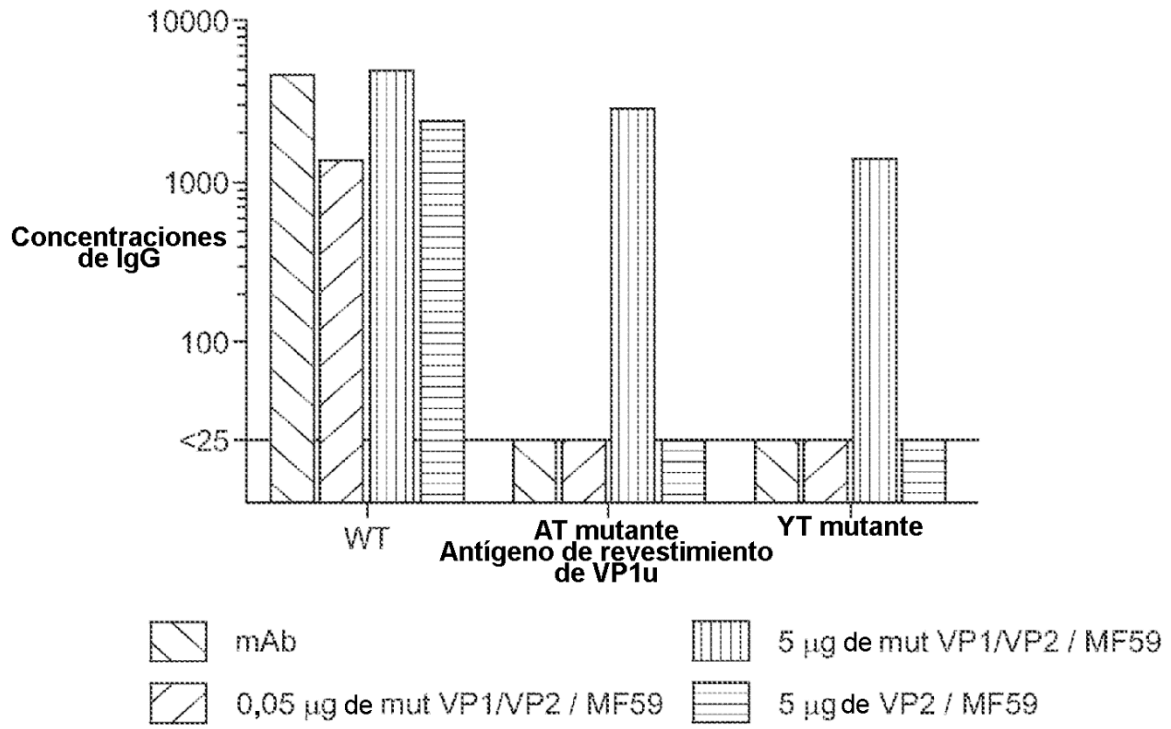
**FIG. 1**

región VP1u	167	PYTHW	171
		PY HW	
epítipo para MAB8293 (VP2)	336	PYHHW	340

**FIG. 2**



**FIG. 3**  
Concentraciones de IgG



**FIG. 4**

**Alineamiento de secuencia para genotipos 1-3 de Parvovirus B19**

Puntuación total en ClustalW: >90

```

VP1u_B19_Tipo1  MSKESGKWWESDDKFAKAVYQQLVVEFYEKVTGTDLELIQILKDHYNISLDNPLENPSSLF 60
VP1u_B19_Tipo2  MSKESGKWWESDDKFAKDVKQFVEFYEKVTGTDLELIQILKDHYNISLDNPLENPSSLF 60
VP1u_B19_Tipo3  MSKTTDKWWESDDKFAQDVYKQFVQFYEKATGTDLELIQILKDHYNISLDNPLENPSSLF 60
*** ;,*****.***; **:*:*:****.*****

VP1u_B19_Tipo1  DLVARIKNNLKNSPDLYSHHFQSHCQLSDHPHALSSSSSHAEPRGENAVLSSSEDLHKPGQ 120
VP1u_B19_Tipo2  DLVARIKSNLKNSPDLYSHHFQSHCQLSDHPHALSPSSSHTEPRGENAVLSSSEDLHKPGQ 120
VP1u_B19_Tipo3  DLVARIKSNLKNSPDLYSHHFQSHCQLSDHPHALSPSNSSTEPRGENAVLSSSEDLHKPGQ 120
*****.***;*****.***.***:*****

VP1u_B19_Tipo1  VSVQLPGTNYVCGNELQAGPPQSAVDSAARIHDFRYSQLAKLGINPYTHWIVADEELLK 180
VP1u_B19_Tipo2  VSIQLPGTNYVCGYELQAGPPQSAVDSAARIHDFRYSQLAKLGINPYTYWIVADEELLK 180
VP1u_B19_Tipo3  VSIQLPGTNYVCGNELQAGPPQNAVDSAARIHDFRYSQLAKLGINPYTHWIVADEELLK 180
**;***** *****.*****;*****

VP1u_B19_Tipo1  NIKNETGFQAQVVKDYFTLKGAAPVAHFQGSLEVPAYNASEKYP 227
VP1u_B19_Tipo2  NIKNESGFQAQAVKDYFTLKGAAPVAHFQGSLEVPAYNASEKYP 227
VP1u_B19_Tipo3  NIKNETGFQAQAVKDYFTLKGAAPVAHFQGSLEVPAYNASEKYP 227
****;.****.*****
    
```

**FIG. 5**

