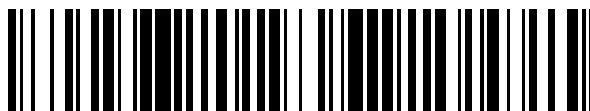


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 738**

51 Int. Cl.:

A61K 31/375 (2006.01)

A61K 31/675 (2006.01)

A61P 31/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2011 E 11726022 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015 EP 2579871**

54 Título: **Formulaciones tópicas antivirales para la prevención de la transmisión del VHS-2**

30 Prioridad:

22.12.2010 US 201061426373 P

23.06.2010 US 357892 P

11.06.2010 US 354050 P

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

23.11.2015

73 Titular/es:

GILEAD SCIENCES, INC. (25.0%)

333 Lakeside Drive

Foster City, CA 94404, US;

ABDOOL KARIM, QUARRAISHA (25.0%);

ABDOOL KARIM, SALIM S. (25.0%) y

KHARSANY, AYESHA (25.0%)

72 Inventor/es:

ABDOOL KARIM, QUARRAISHA;

ABDOOL KARIM, SALIM S.;

KHARSANY, AYESHA;

CIHLAR, TOMAS y

ROONEY, JAMES FRANCIS

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 551 738 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

Formulaciones tópicas antivirales para la prevención de la transmisión del VHS-2

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente a las formulaciones de compuestos con actividad antiviral, para su uso en la prevención de la adquisición y transmisión del virus del herpes simple (VHS-1 y VHS-2), en particular VHS-2.

10 Antecedentes de la invención

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y las enfermedades relacionadas son un gran problema de salud pública en todo el mundo. A pesar de los grandes avances que se han hecho en la prolongación de la vida de los pacientes con SIDA mediante el tratamiento con agentes antivirales, no hay una cura absoluta.

El Virus del Herpes Simple 2 (VHS-2) es otra enfermedad que es un gran problema de salud pública en todo el mundo. Se estima que el VHS-2 está presente en el 20 % de los adultos sexualmente activos en todo el mundo, y en los hombres y mujeres cargados con VIH la prevalencia de la infección por VHS-2 puede elevarse al 80 %. Es la causa más común de la enfermedad de úlcera genital, pero es casi totalmente asintomática.

Se ha demostrado que hay una relación sustancial entre las epidemias de VIH transmitidas sexualmente y el VHS-2, ya que la presencia de VHS-2 facilita la adquisición del VIH. Véase, por ejemplo el documento "The Effects of Herpes Simplex Virus-2 on HIV acquisition and Transmission", J. Acquir. Immune Defic. Syndr., 2004; 35(5), por Lawrence Corey et al., en el que se describe que más de 30 estudios epidemiológicos han demostrado que la prevalencia de VHS-2 se asocia con un riesgo 2 a 4 veces mayor de transmisión y adquisición del VIH.

Por lo tanto, un planteamiento al problema de la adquisición del VIH/SIDA y las enfermedades relacionadas sería reducir los riesgos de transmisión del VIH y VHS-2, para reducir el número de individuos que se convierten en nuevos infectados. También, dado que en muchos países las mujeres resultan afectadas desproporcionadamente por la infección del VIH comparado con los hombres, (la transmisión del VIH de los hombres a las mujeres se estima que tiene una eficacia 7 veces mayor en comparación con las mujeres a los hombres), un planteamiento preferido sería proporcionar composiciones que sean efectivas frente al VIH y VHS-2 y que puedan usar las mujeres con o sin el consentimiento o conocimiento de sus parejas.

El ácido [2-(6-amino-purin-9-il)-1-metil-etoximetil]-fosfónico (tenofovir, FMPA) es un compuesto bien conocido con una actividad antiretroviral potente, útil en el tratamiento de pacientes con SIDA. Véase, por ejemplo, la patente WO2006/017044, en la que se describe una formulación en gel de tenofovir. Los resultados de un ensayo clínico reciente llevado a cabo en Suráfrica con esta formulación en gel de tenofovir confirman la afirmación de que la formulación es eficaz en la prevención de la transmisión del VIH ((Abdool Karim et al., Science 2010; 329: 1168-1174), y también demostraron que la misma formulación en gel de tenofovir es eficaz en dificultar y/o prevenir la transmisión del VHS-2. Esto es sorprendente, dado que a pesar de que las publicaciones previas han indicado que el tenofovir se conoce por ser un agente antiretroviral potente, no se conocía previamente por ser eficaz como un agente anti-herpético (véase, por ejemplo, el documento "Differential Antiherpesvirus and Antiretrovirus effects of the (S) and (R) Enantiomers of Acyclic Nucleoside Phosphonates", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Feb. 1993, p312-338, por J. Balzarini et al., Noesans et al., Antiviral Chemistry and Chemotherapy 8(1), p1-23 (1977), y De Clerq et al., Clinical Microbial Reviews, Vol. 16, N° 4, p569-596 (2003).

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a las formulaciones de compuestos con actividad antiviral, en particular el ácido [2-(6-Amino-purin-9-il)-1-metil-etoximetil]-fosfónico (tenofovir, FMPA), adecuado para la aplicación tópica (por ejemplo, vaginal, rectal, etc.) y su uso en dificultar y/o prevenir la adquisición y transmisión de las infecciones por VHS-2.

En la presente invención, la formulación es un gel que se aplica por vía vaginal a hembra humanas. El gel se aplica antes de la actividad sexual, o después de la actividad sexual, o antes y después de la actividad sexual, una vez o dos veces al día. Una realización de la formulación en gel comprende una mezcla de tenofovir, hidroxietilcelulosa, propilparabeno, metilparabeno, edetato disódico, glicerina, ácido cítrico, y agua purificada hasta el 100 %, con la adición de una pequeña cantidad de hidróxido sódico al 10 % p/p y de ácido clorhídrico al 10 % p/p diluido para ajustar el pH a aproximadamente 4,4. En un ejemplo la formulación en gel comprende:

Ingrediente	% p/p
Tenofovir	0,2-2,00
Hidroxietilcelulosa, NF (Natrasol®250H)	1-5,0
Propilparabeno, NF	0,01-0,10
Metilparabeno, NF	0,1-0,25
Edetato disódico, USP	0,02-0,10
Glicerina, USP	3,00-30,00
Ácido cítrico, USP	0,5-2,00
Agua purificada, USP	<u>hasta 100 %</u>

con la adición de una pequeña cantidad de hidróxido sódico al 10 % p/p y de ácido clorhídrico al 10 % p/p diluido para ajustar el pH a aproximadamente 4,4.

5

Una realización de la formulación en gel comprende:

	% p/p
Tenofovir	1,00
Hidroxietilcelulosa, NF (Natrasol®250H)	2,50
Propilparabeno, NF	0,02
Metilparabeno, NF	0,18
Edetato disódico, USP	0,05
Glicerina, USP	20,00
Ácido cítrico, USP	1,00
Agua purificada, USP	<u>75,25</u>
Total	100,00

con la adición de una pequeña cantidad de hidróxido sódico al 10 % p/p y de ácido clorhídrico al 10 % p/p diluido para ajustar el pH a un objetivo de 4,4.

10

Una segunda realización de la formulación en gel comprende:

	% p/p
Tenofovir	1,00
Hidroxietilcelulosa, NF (Natrasol®250H)	3,0
Propilparabeno, NF	0,005
Metilparabeno, NF	0,22
Edetato disódico, USP	0,05
Glicerina, USP	5,00
Ácido cítrico, USP	1,00
Agua purificada, USP	<u>89,66</u>
Total	100,00

con la adición de una pequeña cantidad de hidróxido sódico al 10 % p/p y de ácido clorhídrico al 10 % p/p diluido para ajustar el pH a un objetivo de 4,4.

15

Una tercera realización de la formulación en gel comprende:

	% p/p
Tenofovir	1,00
Hidroxietilcelulosa, NF (Natrasol®250H)	3,25
Propilparabeno, NF	0,005
Metilparabeno, NF	0,22
Edetato disódico, USP	0,05
Glicerina, USP	5,00
Ácido cítrico, USP	1,00
Agua purificada, USP	<u>89,41</u>
Total	100,00

con la adición de una pequeña cantidad de hidróxido sódico al 10 % p/p y de ácido clorhídrico al 10 % p/p diluido para ajustar el pH a un objetivo de 4,4.

20

Una cuarta realización de la formulación en gel comprende:

25

	<u>% p/p</u>
Tenofovir	1,00
Hidroxietilcelulosa, NF (Natrasol®250H)	3,5
Propilparabeno, NF	0,005
Metilparabeno, NF	0,22
Edetato disódico, USP	0,05
Glicerina, USP	5,00
Ácido cítrico, USP	1,00
Agua purificada, USP	<u>89,16</u>
Total	100,00

con la adición de una pequeña cantidad de hidróxido sódico al 10 % p/p y de ácido clorhídrico al 10 % p/p diluido para ajustar el pH a un objetivo de 4,4.

- 5 Otra realización de la presente invención se refiere al ácido (R)-(1-(6-amino-9H-purin-9-il)propan-2-iloxi)metilfosfónico para su uso en la reducción de o prevención de la transmisión del VHS-2 a un mamífero y para su uso en la reducción de o prevención de la adquisición del VHS-2 por un mamífero, particularmente donde el ácido (R)-(1-(6-amino-9H-purin-9-il)propan-2-iloxi)metilfosfónico se formula como un gel, en el que la formulación comprende:

10

	<u>% p/p</u>
Tenofovir	1,00
Hidroxietilcelulosa, NF (Natrasol®250H)	2,50
Propilparabeno, NF	0,02
Metilparabeno, NF	0,18
Edetato disódico, USP	0,05
Glicerina, USP	20,00
Ácido cítrico, USP	1,00
Agua purificada, USP	<u>75,25</u>
Total	100,00

La presente invención generalmente se refiere a las composiciones y métodos que previenen y/o reducen el riesgo de transmisión del VHS-2 a través de la actividad sexual. Aunque se dirige principalmente a la conducta heterosexual (es decir, la relación sexual vaginal masculino/femenino), las composiciones de la presente invención también son útiles para los grupos que participan en otros tipos de comportamiento sexual. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención se pueden usar por grupos que participan en una relación sexual anal (masculino/femenino o masculino/masculino); las composiciones de la presente invención destinadas para usarse en una relación sexual anal se modifican preferentemente para ajustar la capacidad de tamponamiento a valores de pH que normalmente se encuentran en el recto y para alterar la lubricidad de la formulación.

20

Para la relación sexual vaginal heterosexual, la composición se puede insertar en la vagina antes de la relación sexual. Para una relación sexual anal (heterosexual u homosexual), la composición se puede insertar en el recto antes de la relación sexual. Para cualquiera relación sexual vaginal o anal, la composición también puede actuar como un lubricante. Para añadir protección se prefiere normalmente que la composición se aplique antes de la relación sexual u otra actividad sexual y que, si es apropiado, se use un preservativo. Para aún más protección, la composición se puede re aplicar tan pronto como sea posible tras la finalización de la actividad sexual.

25

Si se desea, se pueden incorporar saborizantes, aromas, fragancias y colorantes en la composición mientras que no interfieran con la seguridad o eficacia de la composición. Ciertamente, la incorporación de dichos saborizantes, aromas, fragancias, y colorantes en las composiciones de la presente invención pueden aumentar la probabilidad de que la composición se usará durante la actividad sexual.

30

Una ventaja del presente método es que se puede usar para la protección durante una amplia variedad de actividades sexuales (vaginal o anal) por heterosexuales, bisexuales, y homosexuales. Otra ventaja del presente método de reducción de la transmisión del VHS-2 es que este método se puede implementar y o usar más fácilmente por la parte que es penetrada. Así, una mujer puede usar el presente método para protegerse a sí misma (así como a su pareja) con o sin el conocimiento de su pareja del método que se usa. Además, no se requerirá que la pareja confíe en la afirmación de su pareja de estar libre de SIDA o en un acuerdo para usar preservativos para protegerse. Una o ambas partes sexuales, (especialmente la participante femenina) podría iniciar e implementar el uso del presente método. Preferentemente el método se usa antes de la actividad sexual y más preferentemente tanto antes como tras la actividad sexual.

35

40

Descripción detallada

Recientemente, en lugar de ensayar nuevos compuestos como potenciales microbicidas, el tenofovir, un inhibidor nucleótido de la transcriptasa inversa (TI) del VIH altamente selectivo y eficiente usado ampliamente en la terapia del VIH, se formuló como un gel al 1 % y se ensayó en un estudio doble ciego placebo-control con aproximadamente 900 mujeres africanas. Los resultados de ensayo mostraron una disminución global del 39 % en la frecuencia de la transmisión sexual del VIH-1. Este efecto profiláctico adicionalmente incremento la reducción a un 54 % de transmisión entre las mujeres con alta adherencia al tratamiento con tenofovir. Así, este ensayo se convirtió en el primer ejemplo de un microbicida que disminuía de manera convincente la transmisión del VIH-1.

Sorprendentemente, se observó también en el ensayo, una reducción significativa del 51 % del riesgo de adquisición del virus del herpes simple tipo 2 (VHS-2). Esta observación es importante, dado que el VHS-2 es un co-patógeno común con el VIH-1 que facilita la transmisión del VIH, presumiblemente mediante la inducción de ulceración e inflamación genital. Éste efecto del gel de tenofovir en el VHS era imprevisto, ya que este fármaco altamente potente antiretroviral y anti-hepatitis se ha mostrado previamente por exhibir mínima, si la hay, actividad in vitro contra el VHS y la mayoría de los otros virus ADN.

El presente estudio proporciona la evidencia de que a las concentraciones alcanzadas por vía vaginal por la administración tópica de un gel de tenofovir al 1 % son equivalentes a las que inhiben la replicación tanto del VHS-1 como del VHS-2 en múltiples líneas de células y tipos celulares primarios. Así, la actividad anti-herpética del tenofovir observada en los ensayos clínicos es un resultado de su actividad anti-herpética directa.

Ahora se hará referencia en detalle a ciertas realizaciones de la presente invención. Aunque la presente invención se describiera en conjunto con las realizaciones enumeradas, se entenderá que no se pretende limitar la presente invención a aquellas realizaciones. Por el contrario, la presente invención pretende cubrir todas las alternativas, modificaciones, y equivalentes, que se pueden incluir dentro del alcance de la presente invención como se define mediante las reivindicaciones.

Definiciones

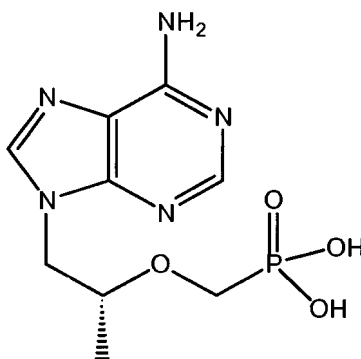
A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos y frases como se usan en el presente documento se pretende que tengan los siguientes significados:

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un sujeto para el tratamiento de una enfermedad, es suficiente para llevar a cabo el tratamiento para la enfermedad. La "cantidad terapéuticamente eficaz" puede variar dependiendo del compuesto, la enfermedad y su severidad, la edad, el peso, etc. del sujeto a tratar.

La "biodisponibilidad" es el grado en el que el agente farmacéuticamente activo se vuelve disponible para el tejido diana tras la introducción del agente en el cuerpo. La mejora de la biodisponibilidad de un agente farmacéuticamente activo puede proporcionar un tratamiento más eficiente y eficaz para los pacientes debido a que, para una dosis dada, más agente farmacéuticamente activo estará disponible en los sitios del tejido diana.

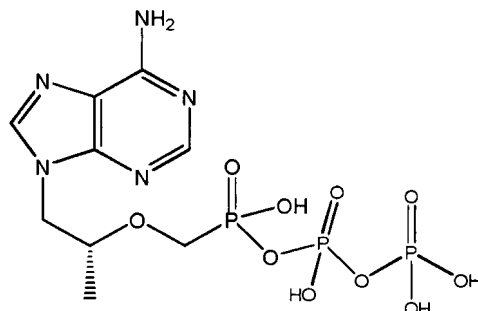
Los compuestos de las combinaciones de la presente invención se pueden referir como "ingredientes activos" o "agentes farmacéuticamente activos".

El FMPA o tenofovir (Patente de Estados Unidos N°. 4.808.716, 5.733.788, 6.057.305) tiene la estructura:



Los nombres químicos de FMPA, tenofovir incluyen: (R)-9-(2-fosfonilmetoxipropil)adenina; ácido (R)-[(1R)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)propan-2-iloxy]metilfosfónico; y ácido fosfónico, [[(1R)-2-(6-amino-9H-purin-9-yl)-1-metiletoxi]metil]. El número de Registro del CAS es 147127-20-6.

El tenofovir difosfato tiene la estructura:



5 y se denomina anhídrido difosfórico (R)-(1-(6-amino-9H-purin-9-il)propan-2-iloxi)metilfosfónico.

También se describe la administración tópica de la formulación al ano. También se describe la aplicación oral que es llevada a cabo adecuadamente mediante la aplicación de una composición que está en la forma de un enjuague bucal o gargarismo. La aplicación oral se prefiere especialmente para prevenir la infección durante procedimientos dentales. Adecuadamente, la composición se aplica justo antes del comienzo del procedimiento dental y periódicamente a lo largo del procedimiento.

La presente invención también incluye formulaciones que son aerosoles, espumas, gelatinas, cremas, supositorios, comprimidos, tampones, etc., y el uso de un preservativo que está recubierto con la formulación. En una realización preferida, el preservativo se recubre con un lubricante o agente que mejora la penetración que comprende un compuesto antiviral, preferentemente el tenofovir. Los lubricantes y agentes que mejoran la penetración se describen en las patentes de Estados Unidos N°. 4.537.776; 4.552.872; 4.557.934; 4.130.667, 3.989.816; 4.017.641; 4.954.487; 5.208.031; y 4.499.154.

20 Ejemplos

Los siguientes ejemplos adicionalmente describen y demuestran realizaciones particulares dentro del ámbito de la presente invención. Los ejemplos se dan únicamente para ilustración y no deben interpretarse como limitaciones ya que son posibles muchas variaciones sin salir del ámbito de las reivindicaciones. Los siguientes ejemplos solo se destinan para ilustración y no se destinan a limitar el ámbito de la presente invención en modo alguno. "Ingrediente activo" indica uno o más INTI, como se definió anteriormente, preferentemente el tenofovir o un derivado fisiológicamente funcional del mismo.

30 MATERIALES Y MÉTODOS

Células. Se cultivaron fibroblastos de pulmón embrionario humano (HEL, por sus siglas en inglés "Human embryonic lung") (HEL-299; ATCC CCL-137) en medio MEM de Earle (Gibco, Invitrogen Corporation, Reino Unido) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (SFB), 1 % de L-glutamina, 1 % de aminoácidos no esenciales y 1 % de piruvato sódico. Se aislaron queratinocitos humanos primarios (PHK, por sus siglas en inglés "Primary human keratinocytes") de prepucios neonatales. Los fragmentos de tejido se incubaron con tripsina-EDTA durante 1 h a 37 °C. Las células epiteliales se separaron y cultivaron en medio libre de suero para queratinocito (MLS-queratinocito), (Gibco, Invitrogen Corporation, Reino Unido) que contenía los siguientes suplementos: 0,5 µg de hidrocortisona por ml, 10 ng de factor de crecimiento epidérmico por ml, 2 mM de L-glutamina, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato sódico, 1 x 10⁻¹⁰ M de toxina del cólera, 5 µg de insulina por ml, 5 µg de transferrina humana por ml y 15 x 10⁻⁴ mg de 3,3',5-triiodo-2-tironina por ml. Los PHK se usaron para los ensayos antivirales en monocapas y para la preparación de cultivos en balsa organotípicos. Las células TZM-bl se proporcionaron amablemente por el Dr. G. Van Ham (ITG, Antwerp, Bélgica).

Virus. Se usaron como referencia de los virus herpes las cepas de VHS-1 KOS y F y las cepas de VHS-2 G y MS. Se usaron varias cepas clínicas de VHS-1 de tipo silvestre (ts) [RV-6, RV-132, RV-134, C559143], VHS-1 deficiente en timidina quinasa (TQ-) [RV-36, RV-117, 328058], VHS-2 ts [RV-24, RV-124, NA, PB, NS, HSV-47] y VHS-2 TQ- [RV-101, RV-129, 19026589, LU, HSV-44] aisladas de individuos infectados por el virus en Bélgica. La cepa del VIH-1 III_B se proporcionó por R.C. Gallo (en ese momento en los National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Compuestos. Las fuentes de compuestos eran las siguientes: aciclovir [ACV, 9-(2-hidroxi-2-etoximetil)guanina], GlaxoSmithKline, Stevenage, Reino Unido; ganciclovir [GCV, 9-(1,3-dihidroxi-2-propoximetil)guanina, Roche, Basel, Suiza; penciclovir [PCV, 9-(4-hidroxi-3-hidroximetilbut-1-il)guanina], Aventis, Frankfurt, Alemania; brivudina [(E)-5-(2-bromovinil)-1-(D-2'-desoxirribofuranos-1-il-uracilo, BVDU], Searle, Reino Unido; (S)-HFMP [cidofovir, CDV, (S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil)citosina], FMEA, [adefovir, ADV, 9-[2-(fosfonilmetoxietil)adenina] y (R)-FMPA [tenofovir, TFV, (R)-9-[2-(fosfonilmetoxipropil)adenina]] Gilead Sciences, Foster City, CA. El tenofovir difosfato (TFV-DF) y el

aciclovir trifosfato (ACV-TF) se obtuvieron de Moravek Biochemicals, Brea, CA.

Radioquímicos. El [^3H]tenofovir (radioespecificidad: 15 Ci/mmol), [^3H]dGTP (radioespecificidad: 17,9 Ci/mmol) y [^3H]dATP (radioespecificidad: 153 Ci/mmol) eran de Moravek Biochemicals (Brea, CA).

Ensayo de reducción del efecto citopático (ECP) del VHS. Se usaron las células HEL y PHK para llevar a cabo el ensayo de reducción del ECP. Ambos tipos de células se cultivaron en una placa microtituladora de 96 pocillos en sus correspondientes medios de crecimiento. Se infectaron monocapas confluentes con cada cepa viral a 100 DICC₅₀ (1 DICC₅₀ corresponde a la dilución madre del virus que es infecciosa para el 50 % de los cultivos celulares). El medio usado para permitir la infección viral y el cultivo en las células HEL era el medio MEM de Earle que contenía un 2 % de SFB. Tras un período de adsorción de 2 h, se retiró el virus residual y las células infectadas se incubaron adicionalmente en un medio que contenía diluciones seriadas de los compuestos del ensayo (por duplicado). Tras 2 a 3 días de período de incubación, se evaluó visualmente la citopaticidad viral (ECP), y se determinó la concentración efectiva al 50 % [CE₅₀, concentración de compuesto requerida para reducir la ECP viral en un 50 %]. Las CE₅₀ de los compuestos ensayados frente a cada cepa viral se calcularon como los valores medios de al menos dos experimentos independientes. Los ensayos se llevaron a cabo de manera similar en los PHK, excepto que se añadió medio Dulbecco-F12 [una mezcla de 1/3 de HAM F12 y 2/3 de medio de Eagle modificado por el de Dulbecco, suplementado con un 10 % de suero fetal bobino (SFB), 2 mM de L-glutamina, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato sódico, 5 ml de antibiótico-antimicótico 100x por litro (Gibco, Invitrogen Corporation)] usado para la infección viral y una mezcla 50/50 (v/v) de MLS-queratinocito y medio Dulbecco-F12 después de la adsorción viral.

Infección por el virus herpes de los cultivos celulares primarios de monocitos/macrófagos. Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humana se obtuvieron de la sangre de donantes seronegativos sanos mediante centrifugación por gradiente de densidad Ficoll-Hypaque. Las CMSP se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con un 20 % de suero fetal bobino (SFB) inactivado por calor (56 °C, 30 min), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 mg/l) y L-glutamina (2mM), después se sembraron en placas de 48 pocillos (1,8 x 10⁶ células/pocillo). Las células monocitos/macrófagos (M/M) se separaron mediante adherencia sobre un plástico. Tras 5 días, las células no adherentes eran cuidadosamente retiradas mediante repetidos lavados suaves con medio caliente, y las M/M adherentes (95 % de pureza) se cultivaron durante 3 días adicionales para madurar y formar una monocapa. Las células renales fibroblastoides de mono verde africano (Vero) altamente sensibles al efecto citopático del VHS-2 se cultivaron en medio RPMI suplementado con un 10 % de SFB inactivado por calor y se usaron en los ensayos de titulación del virus infeccioso. Para evaluar la actividad anti-VHS2 del tenofovir en macrófagos humanos, se añadió el compuesto a los macrófagos 1 hora antes de la infección a concentraciones crecientes (0,04, 0,2, 1, 5, 20, 100 o 500 µg/ml). De manera similar, los cultivos de macrófagos se trataron con diferentes concentraciones de adefovir (0,04, 0,2, 1, 5, 20 o 100 µg/ml) o aciclovir (0,008, 0,04, 0,2, 1, 5, 20 o 100 µg/ml) usados como un fármaco control.

Después los cultivos de macrófagos se infectaron con VHS-2 (100 DICC₅₀) en presencia de los compuestos del ensayo. Tras 2 hrs de adsorción del virus, los cultivos se lavaron exhaustivamente para retirar cualquiera de las partículas residuales del virus. Después el medio de cultivo fresco y los compuestos, a las concentraciones indicadas, se añadieron a los cultivos. El tenofovir, adefovir y aciclovir se mantuvieron a lo largo del experimento. También se pusieron en marcha para cada experimento apropiados controles positivos (M/M infectadas pero no tratadas) y negativos falsamente infectados (M/M no infectadas y no tratadas). Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado. El efecto citopático en los macrófagos se monitorizó diariamente por observación microscópica y se alcanzó la finalización en el día 5-6 de post infección. Por lo tanto, el potencial efecto inhibitorio de los compuestos en la replicación del VHS-2 se evaluó 6 días tras la infección. La cantidad de virus infeccioso en los sobrenadantes se determinó mediante un clásico ensayo de dilución limitante en los cultivos celulares vero. Los títulos de los virus producidos se calcularon de acuerdo con el método de Reed y Muench y se expresaron como la dosis infectiva del 50 % del cultivo de tejido por ml (DICT₅₀/ml). La capacidad de inhibición se expresó en % y se calculó considerando como valor 100 la producción de virus en los cultivos no tratados infectados por el virus.

Co-infección de las células TZM-bl con VIH-1 y VHS-2. La línea celular TZM-bl se deriva de las células HeLa y expresa altos niveles de CD4, CCR5 y CXCR4. Además, esta línea celular se transduce establemente con una luciferasa de luciérnaga dirigida por el LTR y un gen galactosidasa de E. coli (15). En una bandeja de 96 pocillos, se sembraron 10.000 células TZM-bl en el día 1. En el día 2, se aspiró el sobrenadante y se añadió 100 µl de diluciones seriadas de tenofovir a los cultivos celulares. Después, se administró 100 µl de una suspensión del virus que contenía o VIH-1 (NL4.3), VHS-2 (G) o ambos virus juntos. De dos a tres días tras de la infección, se monitorizó la infección por VIH-1 basada en la determinación de la actividad de la luciferasa. Para este propósito, se retiró 100 µl de sobrenadante del cultivo y se añadió 100 µl de Bright-Glo Luciferase Assay Substrate (Promega, Madison, Estados Unidos). La señal de luminiscencia se midió usando el lector de placas microtituladoras Safire 2 (Tecan, Mannedorf, Suiza). También se incluyó una condición de control que contenía solo células falsamente infectadas para medir los niveles de luminiscencia de base. Tres días tras la infección, se registró microscópicamente la citopaticidad inducida por VHS-2 basada en la formación de células gigantes.

Cultivos en balsa epiteliales organotípicos. Para la preparación de equivalentes epidérmicos, se preparó una solución de matriz de colágeno con colágeno mezclado en hielo con un medio de HAM F12 10 veces concentrado, un tampón de reconstitución 10 veces concentrado y fibroblastos Swiss 3T3 J2. Un mililitro de la solución de matriz de colágeno se vertió en los pocillos de las placas microtituladoras de 24 pocillos. Después de la equilibración del gel con 1 ml de medio de cultivo durante la noche a 37 °C, se sembraron $2,5 \times 10^5$ células de PHK en la parte superior de los geles y se mantuvieron sumergidas durante 24-48 horas. Las balsas de colágeno se levantaron y se colocaron en rejillas de acero inoxidable en la interfase entre el aire y el medio de cultivo líquido. El medio de cultivo era una mezcla de 1/3 de HAM F12 y 2/3 de medio de Eagle modificado por el de Dulbecco, con los mismos suplementos que se usaron para el MLS-queratinocito. Las células epiteliales se dejaron estratificar, reemplazándose el medio cada 2-3 días. Para la evaluación de los efectos antivirales de los compuestos en el sistema de balsas, se pusieron en marcha dos series de balsas en paralelo, una para examinación histológica y la otra para la cuantificación de la producción viral mediante un ensayo de reducción de placa. Las balsas se infectaron con 5.000 UFP de cepas de VHS-1 (KOS) o VIH-2 (G) tras 10 días tras la suspensión y después el medio se reemplazó por un medio que contenía diferentes diluciones de los compuestos. El medio de cultivo que contenía las diferentes concentraciones de los compuestos se cambió dos días más tarde y 3 días más tarde (tras 15 días de diferenciación), unas series de balsas se fijaron en 10 % de formalina tamponada, se incrustaron en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina para la evaluación histológica. Otras series de balsas se usaron para cuantificar la producción de virus. Para ese propósito, cada balsa se congeló en 3 ml de tampón fosfato salino (PBS) y se descongeló para liberar el virus del epitelio infectado. Los sobrenadantes se clarificaron mediante centrifugación a 1.800 rpm y se titularon mediante ensayo de placa en cultivos celulares HEL. Después se calculó la producción de virus en cada balsa. Se usaron dos balsas para cada concentración de fármaco para determinar los efectos de los compuestos en la producción de virus.

Tejidos humanos ex vivo. Los tejidos de las amígdalas humanas se obtuvieron de pacientes sometidos a amigdalectomía rutinaria en el Children's National Medical Center (Washington, DC) bajo el protocolo IRB aprobado. Los tejidos cervicales se obtuvieron a través del National Disease Research Interchange (NDRI, Philadelphia, PA). Los tejidos se diseccionaron en bloques de aproximadamente 8 mm³ y se colocaron en geles de esponja de colágeno en el medio de cultivo en la interfase aire-líquido, como se describió anteriormente (16). Brevemente, los bloques de tejido se cultivaron en el medio RPMI 1640 (GIBCO BRL, Grand Island, NY) que contenía un 15 % de suero fetal bovino inactivado por calor (SFB; Gemini Bio-Products, Woodland, CA).

Tejido de la amígdala: Para cada condición experimental, 27 bloques de tejido (9 bloques/pocillo/3 ml de medio completo) se inocularon con 5 µl de suministro viral de VHS-1 (cepa F) o VHS-2 (cepas G y MS) (ATCC) colocados en la parte superior de cada bloque de tejido. Los experimentos de coinfección se llevaron a cabo al inocular bloques de tejido secuencialmente con 5 µl de VHS-2 (cepa G) y 5 µl (0,5 ng de p24) de X4_{LAI.04} (obtenido de la Rush University Virology Quality Assurance Laboratory (Chicago, IL)). En todos los experimentos que usaron tejidos de las amígdalas, el tenofovir se añadió al medio de cultivo 12 h antes de la infección viral y se reemplazó en cada cambio de medio de cultivo.

Tejido cervico-vaginal: Para cada condición experimental se sumergieron 16 bloques de tejido en 500 µl de una suspensión VHS-2 (cepa G) durante 2 horas a 37 °C, se lavaron tres veces con PBS y después se colocaron en las balsas de espuma de gel. El tenofovir se añadió durante la infección y se repuso en cada cambio del medio de cultivo. La replicación viral del herpes simple se evaluó mediante la liberación del ADN viral en el medio de cultivo mientras se medía por PCR cuantitativa en tiempo real (17). La replicación de VIH-1 se evaluó mediante la liberación del antígeno de la cápside p24 usando un ensayo de microesferas (18).

Actividad antiviral in vivo de los ratones infectados por VHS-1 y VHS-2. Los ratones atímicos desnudos NMRI adultos (que pesaban ~ 20 g) se escarificaron en la región lumbosacra sobre una superficie de aproximadamente 1 cm². Los ratones se inocularon con 5×10^3 UFP de VHS-1 (cepa Kos) o 5×10^2 de VHS-2 (cepa G) en 50 µl por ratón. Las formulaciones tópicas al 1 % de tenofovir, adefovir, y cidofovir se prepararon en 100 % dimetilsulfóxido o en un gel idéntico al usado en el ensayo CAPRISA 004. En cada experimento, un grupo de animales tratados con una formulación placebo que era la misma que la formulación del ensayo sin fármaco se incluyó como control negativo. En el protocolo de tratamiento, a los animales se les administró tenofovir, adefovir, o cidofovir tópicamente en la formulación indicada y la concentración del fármaco dos veces al día durante un periodo de cinco días comenzando 1-2 h tras la infección. El día de la inoculación del virus siempre se consideró como el día 0. Todos los procedimientos de los animales se aprobaron por la K.U.Leuven Animal Care Committee. El desarrollo de las lesiones y la mortalidad se registraron durante un periodo de un mes. Los animales se sacrificaron cuando se produjo una pérdida de peso corporal de más del 30 % o el desarrollo de parálisis. Las tasas de supervivencia se estimaron de acuerdo con el método Kaplan-Meier y se compararon usando el ensayo log-rank (Mantel-Cox) y (GraphPad Prism).

Metabolismo de tenofovir en cultivos celulares de linfocitos CEM, fibroblastos HEL y epiteliales T2M-bl. El metabolismo del tenofovir radiomarcado se monitorizó de la siguiente forma: las células CEM, HEL o T2M-bl se sembraron a 4×10^5 , $5,1 \times 10^5$ y 17×10^5 células/ml, respectivamente, en frascos de cultivo de 5 ml (25 cm²) y se incubaron con 2 µM de [2,8-³H]tenofovir (10 µCi/frasco). El fármaco radiomarcado se añadió a los cultivos celulares durante 24 hrs a 72 hrs tras el momento de sembrado de las células. En este punto de tiempo, las células se centrifugaron (tras la separación previa del receptor del cultivo para células HEL y T2M-bl) a 4 °C, se lavó

completamente dos veces con medio enfriado con hielo (sin suero) y se precipitó con 60 % de metanol frío. Tras la centrifugación a 10.000 rpm, el [³H]tenofovir radiomarcado y sus metabolitos en los sobrenadantes se cuantificaron mediante análisis por HPLC usando una columna de compresión radial Partisil-SAX-10 como se describió previamente (19). Los tiempos de retención para el [³H]tenofovir, el [³H]tenofovir-MF y el tenofovir-DF eran aproximadamente a 5, 16 y 32 min.

Ensayo de polimerasa de ADN de VHS-1 y transcriptasa inversa de VIH-1. La mezcla de reacción (40 µl) para los ensayos de la polimerasa de ADN de VHS-1 y TI de VIH-1 contenían 4 µl de premezcla (200 mM de Tris.HCl, pH 7,5; 2 mM de DTT; 30 mM de MgCl₂), 4 µl de ASB (5 mg/ml), 1,6 µl de ADN de timo de ternera activado (1,25 mg/ml), 0,8 µl de dCTP (5mM), 0,8 µl de dTTP (5mM), 0,8 µl de dGTP (5mM), 2 µl de [³H]dATP radiomarcado (1 mCi/ml) (3,3 µM), 18 µl de H₂O y 4 µl de tenofovir-DF a diferentes concentraciones (es decir 200, 20, 2, 0,2 µM). La reacción se inició mediante la adición de 4 µl de polimerasa de ADN de VHS-1 recombinante (proporcionada amablemente por M.W. Wathen (Pfizer, Kalamzoo, MI)) o TI recombinante de VIH-1 (en 20 mM de Tris.ClH, pH 8,0; 1 mM de DTT; 0,1 mM de EDTA; 0,2 M de NaCl; 40 % de glicerol), y la mezcla de reacción se incubó durante 60 min (polimerasa de ADN de VHS-1) o 30 min (TI de VIH-1) a 37 °C. Después, se añadió 1 ml de 5 % de TCA enfriado con hielo en 0,02 M de Na₄P₂O₇·10 H₂O para terminar la reacción de polimerización, tras lo cual el precipitado insoluble ácido (ADN radiomarcado) se capturó en filtros de fibra de vidrio Whatman de tipo GF/C (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, Reino Unido) y adicionalmente se lavó con 5 % de TCA y etanol para retirar el dATP radiomarcado libre. La radioactividad se determinó en un contador de centello líquido Perkin Elmer Tri-Carb 2810 TR.

RESULTADOS

Inhibición de la replicación de VHS-1 y VHS-2 por Tenofovir en múltiples tipos de células permisivas

La actividad del tenofovir frente a cepas de laboratorio de VHS se evaluó primero en monocapas de células HEL y en queratinocitos humanos primarios (PHK) y se comparó con la actividad anti-VHS de análogos de nucleósido (es decir aciclovir, penciclovir, ganciclovir, y brivudina) y de nucleótido de fosfonato acíclico (ANP) (por sus siglas en inglés acyclic nucleotide phosphonate) (es decir cidofovir y adefovir). El tenofovir inhibió la citopaticidad inducida por el virus con valores CE₅₀ de ~ 100 a 200 µg/ml frente a VHS-1 y VHS-2 en los PHK. Los valores CE₅₀ para el adefovir eran de 3,6 a 13 µg/ml y para el cidofovir de 0,63 a 4,4 µg/ml. Excepto para la brivudina, que se sabe que tiene una actividad marcadamente menor frente a VHS-2 que frente a VHS-1, los análogos de nucleósido demostraron ser más activos que cualquiera de los análogos de nucleótido de fosfonato acíclico ensayados.

El tenofovir se evaluó también junto con los nucleósidos de fosfonato acíclicos (ANP) adefovir y cidofovir, y con varios análogos de nucleósido frente a varios aislados clínicos de VHS-1 y VHS-2, incluyendo cepas de virus de tipo silvestre y resistentes a aciclovir en cultivos celulares de fibroblastos HEL. El tenofovir inhibió los efectos citopáticos de todos los aislados clínicos con valores medios de CE₅₀ de 130 µg/ml (intervalo de 114-160 µg/ml), ≥ 166 µg/ml (intervalo de 117- ≥ 200 µg/ml), ≥ 157 µg/ml (intervalo de 125- ≥ 200 µg/ml), y 152 µg/ml (intervalo 131-179 µg/ml) frente a, respectivamente, VHS-1 ts, VHS-1 deficiente en timidina quinasa TQ⁻, VHS-2 ts, y VHS-2 deficiente en timidina quinasa TQ⁻. Cuando se ensayaron en paralelo, el adefovir mostró valores medios de CE₅₀ que eran de 20 a 32 veces menores que los observados para el tenofovir mientras que el cidofovir era el ANP más activo con valores medios de CE₅₀ que variaron entre 0,35 µg/ml y 0,67 µg/ml. De este modo, los valores antiherpéticos de CE₅₀ para el tenofovir eran de 181 a 474 veces más altos que para el cidofovir. A diferencia de los ANP ensayados que mostraron valores de CE₅₀ similares para los aislados clínicos de VHS de tipo silvestre y TQ⁻ mutante, el aciclovir, ganciclovir, penciclovir y brivudina perdieron su actividad antiherpética frente a las cepas de virus herpes deficientes en timidina quinasa.

También se han evaluado el tenofovir, adefovir y aciclovir para su actividad anti-VHS-2 en cultivos celulares primarios de monocitos/macrófagos (M/M). La producción del virus herpes ascendió hasta 2,8 ± 0,9 × 10⁵ DICT₅₀/ml en los sobrenadantes de los cultivos control infectados con el virus, que resultaron en un efecto citopático (ECP) visible microscópicamente en el 90-100 % (Fig.1). El tenofovir a ambas concentraciones de 500 y 100 µg/ml suprimió completamente la replicación del virus sin ningún signo de ECP visible microscópicamente en el día 6 tras la infección por el virus. A 20 y 5 µg/ml, los títulos del virus en los sobrenadantes del cultivo eran más de un log menores que en los controles no tratados que resultaron en un ECP visible en el ~ 5 % y 30 %, respectivamente. A concentraciones de fármaco de 1 µg/ml o 0,2 µg/ml, no se observó un efecto protector pronunciado del tenofovir (2,5 × 10⁵ DICT₅₀/ml; ECP ≥ 70-80 %) (Fig. 1). Como se esperaba, el adefovir era más activo antiviralmente en los M/M. A unas concentraciones de fármaco entre 500 y 5 µg/ml, ni se encontraron partículas virales en los sobrenadantes ni ECP visible en los cultivos celulares. Incluso las concentraciones tan bajas como 1 y 0,4 µg/ml de adefovir redujeron marcadamente los títulos de VHS (8,5 × 10² y 5,4 × 10³ DICT₅₀/ml) y el ECP visible era 5 % y 45 % respectivamente. Como se esperaba, el fármaco aciclovir antiherpético establecido resultó extremadamente eficiente en la inhibición de la replicación del virus herpes en los cultivos celulares de M/M (supresión completa del virus liberado en los sobrenadantes y citopaticidad no visible a concentraciones iguales a o mayores de 0,008 µg/ml).

Inhibición de la replicación del VHS-2 por Tenofovir en cultivos celulares epiteliales T2M-bl infectados por VIH

Las células epiteliales T2M-bl se derivan de las células HeLa transfectadas con los co-receptores CD4, CXCR4 y CCR5 del VIH. Pueden infectarse tanto por VIH como VHS. Estas células se coinfectaron con VIH-1 (NL4.3) y VHS-2 (G) y se monitorizó la replicación del VIH mediante la expresión de luciferasa dirigida por el LTR (luminiscencia), y la replicación del VHS-2 mediante lectura microscópica de la citopaticidad inducida por el virus. El tenofovir previno la infección por VHS-2 en los cultivos coinfectados a una concentración del fármaco de ~ 60 µg/ml, que es similar a la concentración del tenofovir requerida para inhibir individualmente los cultivos celulares de T2M-bl infectados por VHS-2. También, el VIH-1 era igualmente suprimido por el tenofovir en la presencia o ausencia de una infección en curso por VHS-2 (dato no mostrado). De este modo, en las condiciones experimentales de infección doble por VIH-1 y VHS-2, cada virus no afectó la actividad antiviral del tenofovir frente al otro virus.

Supresión de la replicación viral por Tenofovir en cultivos en balsa epiteliales organotípicos

Debido a que los queratinocitos diferenciados son las principales células diana para la infección productiva del VHS in vivo, se evaluó la actividad antiviral del tenofovir en los cultivos en balsa organotípicos de queratinocitos. En este modelo de cultivo tridimensional, los queratinocitos se diferencian completamente, por lo que se asemeja fielmente el estado del tejido in vivo. En este sistema se comparó la capacidad del tenofovir, adefovir y cidofovir para reducir la replicación de VHS. Los cultivos en balsa epiteliales organotípicos se infectaron tras 10 días de diferenciación y se trataron con diluciones seriadas de los compuestos del ensayo. Quince días tras la suspensión (es decir tras 5 días de tratamiento), las balsas se procesaron para el examen histológico y para la cuantificación viral. El examen histológico de las secciones del cultivo mostraron un epitelio totalmente diferenciado con capas características en las balsas del control mientras que las balsas infectadas con VHS mostraron una infección viral pronunciada y una propagación viral a lo largo del epitelio. (Fig.2). La infección de las balsas con VHS produjo efectos citopáticos que resultaron en la distensión y degeneración reticular de los queratinocitos junto con la aparición de cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos, formación de vesículas intraepiteliales típicas y multinucleación.

Los análisis morfológicos de los cultivos organotípicos mostraron que el tratamiento con el tenofovir a 200 µg/ml y 50 µg/ml protegieron todo el epitelio frente a la citopaticidad inducida por el VHS-2, mientras que a 20 µg/ml y 5 µg/ml, el compuesto era parcialmente protector, con áreas de un epitelio normal y áreas con balsas destruidas (Fig. 2). A una concentración de 2 µg/ml el tenofovir era inactivo frente al VHS-2. La administración del adefovir a ≥ 2 µg/ml y del cidofovir a 0,2 µg/ml resultó en una protección completa del tejido epitelial (dato no mostrado). No se observaron efectos tóxicos, medidos como un aumento en el número de células muertas o una alteración de la diferenciación, a la mayor concentración de todos los compuestos ensayados (200 µg/ml para el tenofovir, y 50 µg/ml para el adefovir y el cidofovir). El efecto anti-VHS selectivo del tenofovir, adefovir, y cidofovir también se confirmó cuando los cultivos en balsa se infectaron con una cepa de laboratorio VHS-1 de referencia. En este caso, la protección completa del efecto citopático inducido por el virus se observó a una concentración de 200 µg/ml de tenofovir, 2 µg/ml de adefovir, y ≥ 0,5 µg/ml de cidofovir. Concentraciones menores de los compuestos resultaron en una protección parcial (es decir 50 µg/ml de tenofovir) o una destrucción completa (es decir 20 µg/ml de tenofovir) del epitelio.

Para cuantificar los efectos antivirales del tenofovir comparados con el adefovir y cidofovir, se determinó la producción de virus por balsa mediante PCR cuantitativa. Como se muestra en la Fig. 3, se observó una inhibición dependiente de la concentración de la producción viral por balsa siguiendo el tratamiento de las balsas con concentraciones seriadas de los compuestos. El tenofovir demostró una reducción log de 2,6 (VHS-1) y de 5,4 (VHS-2) en la producción de virus (unidades formadoras de placas (UFP)) a la mayor concentración ensayada (es decir 200 µg/ml). A una concentración de tenofovir de 50 µg/ml, se observó una reducción en la producción de virus de 0,81 (VHS-1) y 1,75 (VHS-2) logs. Incluso a 20 µg/ml, se observó una reducción de 0,9 log en la producción de virus en las balsas infectadas con VHS-2. Concentraciones menores del compuesto eran capaces de reducir la replicación del virus en las balsas. Como se esperaba, tanto el adefovir como el cidofovir demostraron más actividad frente a la replicación del VHS que el tenofovir (Fig. 3A y 3B).

Supresión del virus del herpes simple tipo 2 por Tenofovir en tejido linfóide humano ex vivo infectado individualmente y coinfectado con VIH-1

Se investigó el efecto del tenofovir en la replicación de la cepa F del VHS-1 (VHS-1_F), cepa G del VHS-2 (VHS-1_G) y la cepa MS del VHS-2 (VHS-2_{MS}) en tejidos de las amígdalas humanas ex vivo infectados (Fig. 4). Este sistema soporta la replicación de diversos virus (17) sin estimulación exógena o activación. Tras la inoculación en este sistema de tejido similar a in vivo, VHS-1_F, VHS-2_G o VHS-2_{MS} se replicaron eficientemente como se muestra por la presencia de ADN viral en el medio de cultivo que baña los bloques de tejido. Los tejidos de todos los donantes ensayados soportaron una infección viral productiva pronunciada con una acumulación media del genoma de ADN viral en el medio de cultivo a lo largo de los 9 días de cultivo alcanzando 7,8 log₁₀ copias de ADN /ml [Rango intercuartil (RIQ) 7,1-8,1, n=5], 7,25 log₁₀ copias/ml (RIQ 7,2-7,9, n=6) y 6,4 log₁₀ copias/ml (RIQ 6,1-7,5, n=3) para VHS-1_F, VHS-2_G y VHS-2_{MS}, respectivamente.

Para ensayar el efecto del tenofovir en la replicación del VHS, se trataron durante la noche bloques de tejidos de las amígdalas humanas con concentraciones del fármaco variando de 3 a 240 µg/ml y se infectaron con VHS-1_F, VHS-2_G o VHS-2_{MS}. El tenofovir se mantuvo a lo largo de todo el periodo de cultivo y se reemplazó con cada cambio de medio. El tenofovir suprimió la replicación del VHS-1_F, VHS-2_G y VHS-2_{MS} de manera dependiente de la dosis con

un CE₅₀ de 7 µg/ml [Intervalo de confianza (IC) del 95 %: 10-44] para VHS-1_F; 14 µg/ml (IC: 10-163] para VHS-2_G (Fig. 4A), y 19 µg/ml (IC: 27-127] para VHS-2_{MS}. Por lo tanto, el tenofovir a la concentración de 66 µg/ml redujo la replicación del VHS-1_F, VHS-2_G y VHS-2_{MS} en respectivamente $99 \pm 0,1$ %, 94 ± 7 % (Fig. 4A) y 89 ± 2 % comparado con el tejido no tratado compatible al del donante infectado ($p < 0,01$). Al día 9 tras la infección en los tejidos tratados con 66 µg/ml de tenofovir, la replicación de VHS-1_F medida por la liberación del ADN viral en el medio de cultivo era de $4 \log_{10}$ copias de ADN/ml (RIQ 3,9 - 4,3) comparado con $8 \log_{10}$ copias de ADN/ml (RIQ 7,87 - 8,04) en el tejido del donante compatible no tratado ($n=3$). De manera similar, en el día 9 tras la infección, la replicación de VHS-2_G y VHS-2_{MS} resultó en $7,6 \log_{10}$ copias de ADN/ml (RIQ 7,4-7,8) y $7,3 \log_{10}$ copias de ADN/ml (RIQ 6,9-7,6), respectivamente, en tejidos no tratados, mientras que era $5,2 \log_{10}$ copias de ADN/ml (RIQ 3,6-6,1, $n=14$) y $5,8 \log_{10}$ copias de ADN/ml (RIQ 5,7-6,1, $n=3$) en tejidos de los donantes compatibles tratados con 66 µg/ml de tenofovir.

Incluso a las mayores concentraciones del fármaco, la supresión de la replicación del VHS-1_F, VHS-2_G y VHS-2_{MS} no se asoció con la depleción medible de linfocitos en el tejido de la amígdala: no hubo diferencias estadísticamente significativas en el número absoluto de las células T totales (CD3⁺), células B totales (CD19⁺) o subconjuntos de células T naive y de memoria entre los tejidos tratados con 60 µg/ml de tenofovir y los tejidos no tratados compatibles al de los donantes ($n=3$, $p > 0,4$).

Para evaluar la actividad antiviral doble del tenofovir frente al VHS-2 y VIH-1, se coinfectaron tejidos de la amígdala con VHS-2_G y VIH-1_{X4LAI} como se describió anteriormente (16) y se trataron con tenofovir a la concentración de 66 µg/ml a lo largo de todo el periodo de cultivo. En los tejidos control no tratados, el ADN del VHS-2_G liberado en el medio de cultivo era $7,3 \log_{10}$ copias/ml (RIQ 6,8-7,4) mientras que los tejidos tratados con tenofovir compatibles con los del donante coinfectado con VIH-1, el ADN del VHS-2_G liberado en el medio de cultivo era $5 \log_{10}$ copias/ml (RIQ 4-5,7, $n=6$). Por lo tanto, en estos tejidos, 66 µg/ml de tenofovir suprimieron la replicación del VHS-2_G en el 96 ± 1 % ($n=6$; $p < 0,01$) (Fig. 4B). En el día 9 tras la infección, la replicación del VIH-1_{X4LAI} como se midió por la liberación de p24 en el medio de cultivo se suprimió por completo en todos los tejidos ensayados (2462 ± 1117 pg/ml en controles no tratados frente a 0 pg/ml en los tejidos tratados con tenofovir compatibles al de los donantes (Fig. 4B)).

Para confirmar la especificidad de la actividad antiviral del tenofovir en VHS-2_G, se trataron tejidos con el potente nucleósido inhibidor de la transcriptasa inversa (INTI) del VIH lamivudina a la concentración de 33 µg/ml. En los tejidos de dos donantes, no se encontró ningún efecto de la lamivudina en la replicación de VHS-2_G comparado con los tejidos infectados por VHS-2_G compatibles al de los donantes no tratados (dato no mostrado). Como se esperaba, la lamivudina ha mostrado un efecto potente en la replicación de VIH-1. Por lo tanto, el efecto antiherpético del tenofovir no es una propiedad general de los INTI.

También, para evaluar los posibles efectos inmunomoduladores del tratamiento con tenofovir en tejidos de amígdalas ex vivo, se midió la concentración de 20 citoquinas (IL-1, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IFN, CCL3/MIP-1, CCL4/MIP-1, CCL20/MIP3, CCL5/RANTES, CXCL12/SDF-1, TGF, TNF, CCL2/MCP-1, CCL11/Eotaxin, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10^{*)} en el medio de cultivo de los tejidos compatibles al de los donantes tratados durante 9 días con tenofovir a una concentración de 66 µg/ml. En el día 9 tras la infección no hubo diferencias significativas entre las concentraciones de cualquiera de las citoquinas evaluadas en los tejidos no tratados y los tejidos tratados con tenofovir ($p > 0,15$).

Supresión de VHS-2 por Tenofovir en tejidos cervico-vaginales humanos ex vivo

Para investigar la actividad anti VHS del tenofovir en los bloques de tejidos cervico-vaginales de este tejido se cultivaron como se describió anteriormente, se inocularon con VHS-2_G y se trataron con el fármaco. El tenofovir a la concentración de 166 µg/ml se añadió en el momento de la infección por VHS-2_G y se mantuvo a lo largo de la duración del experimento al reponerlo con cada cambio de medio. La replicación del VHS-2_G se evaluó por la liberación del ADN viral en el medio de cultivo que bañaba los bloques de tejido cervico-vaginal (16 bloques por condición). En los tejidos control no tratados con tenofovir, la replicación viral se detectó en los tejidos de todos los 5 donantes ensayados con una producción acumulada media de $6,6 \log_{10}$ copias/ml (RIQ 5,3 - 8,2) a lo largo de 12 días de cultivo. En los tejidos cervico-vaginales tratados con tenofovir, la producción viral se redujo a $5,5 \log_{10}$ copias/ml (RIQ 4,8 - 5,7, $n=5$) (Fig. 4C y Fig. 4D) reflejando una reducción del 78 ± 9 % cuando se promediaron las reducciones de la replicación viral en cada experimento ($p < 0,01$).

Actividad de Tenofovir en ratones infectados con VHS

El tenofovir, adefovir, y cidofovir se evaluaron como antiherpéticos en los ratones infectados por VHS-1 y VHS-2 usando dos vehículos diferentes - DMSO (Fig. 5) y un gel usado en el estudio CAPRISA 004 (dato no mostrado). Todos los compuestos se administraron a los ratos infectados por VHS-1 y VHS-2 a una concentración del 1 % durante 5 días, comenzando en el día de la infección. Tanto la morbilidad como las curvas de supervivencia de los ratones infectados con VHS-1 y tratados con tenofovir al 1 % se retrasaron significativamente comparado con el grupo tratado con placebo. Como se esperaba, el adefovir mostró ser más eficaz tanto en el DMSO (Fig. 5A) como en las formulaciones en gel (dato no mostrado) comparado con el tenofovir ya que se observó una supervivencia del 80 % y 100 % cuando los animales recibieron adefovir al 1 % en DMSO o gel, respectivamente. Cabe mencionar que los ratones tratados con adefovir al 1 % en la formulación en DMSO murieron sin desarrollar lesiones cutáneas (Fig. 5A). El tratamiento con cidofovir también en el DMSO o en la formulación en gel protegió completamente a los ratones frente a la morbilidad y mortalidad inducida por el virus.

Cuando el tenofovir se evaluó en la formulación en DMSO frente al VHS-2, hubo de nuevo una diferencia estadísticamente significativa en las curvas de supervivencia y las curvas de morbilidad entre el grupo que recibió tenofovir comenzando el día de la infección frente al grupo placebo. El tratamiento de los ratones infectados por VHS-2 con adefovir al 1 % o cidofovir al 1 % resultó en una protección del 80 % y 100 % frente a la morbilidad y mortalidad inducida por el virus, respectivamente (Fig. 5B). De manera similar, cuando se formuló en el gel al 1 %, el tenofovir retrasó la aparición de lesiones relacionadas con el virus del herpes y la posterior muerte de los animales (dato no mostrado). El cidofovir formulado en gel resultó en una protección del 80 % frente a la morbilidad y mortalidad inducida por el VHS-2 mientras que el adefovir, en las mismas condiciones experimentales, proporcionó un retraso significativo en la aparición de las lesiones y la posterior muerte.

El Tenofovir se convierte eficientemente en su metabolito antiviralmente activo en los cultivos celulares de linfocitos, epitelio y fibroblastos.

La conversión metabólica del tenofovir en su metabolito antiviralmente activo (difosforilado) se estudió en cultivos celulares CEM de linfocitos humanos (usado para los experimentos de infección por VIH) y epitelio humano TZM-bl y fibroblastos HEL (usados para los experimentos de infección por VHS) de acuerdo con los procedimientos establecidos previamente (19). El tratamiento de las células con 2 μ M [2,8- 3 H]tenofovir de 24 horas a 72 horas tras el inicio de los cultivos resultó en la formación de tenofovir difosfato, alcanzando los niveles de 13, 6 y 15 pmoles/ 10^9 células en células T- linfoides, células epiteliales, y fibroblastos, respectivamente. Por lo tanto, el tenofovir se convierte eficientemente a su metabolito antiviralmente activo en múltiples tipos de células diferentes que representan células diana relevantes para la infección del VIH o VHS in vivo.

El metabolito activo de tenofovir inhibe eficazmente tanto el ADN polimerasa de VHS como la transcriptasa inversa de VIH.

Para convertirse en activo como un inhibidor de la ADN polimerasa del virus del herpes que codificada en el virus o de la transcriptasa inversa del VIH-1, el tenofovir necesita convertirse mediante enzimas celulares a su derivado difosforilado (tenofovir-DF). El metabolito activo se ha evaluado por su actividad inhibitoria frente a las enzimas diana, usando ADN activado de timo de ternera como el cebador/molde y [2,8- 3 H]dTAP como el sustrato competidor. El tenofovir-DF inhibió eficientemente tanto la TI de VIH-1 (CI_{50} : 4,3 μ M] y la ADN polimerasa de VHS-1 (CI_{50} : 1,3 μ M). Por lo tanto, la actividad antiherpética del tenofovir en el cultivo celular, cultivos en balsa epiteliales organotípico, tejido linfóide humano y cervical ex vivo, y ratones infectados por el virus se puede explicar mediante la inhibición de la ADN polimerasa viral por su metabolito activo tenofovir-DF.

Formulación (Gel vaginal)

	(% p/p)
Tenofovir	1,00
Hidroxietilcelulosa, NF (Natrasol®250H)	2,50
Propilparabeno, NF	0,02
Metilparabeno, NF	0,18
Edetato disódico, USP	0,05
Glicerina, USP	20,00
Ácido cítrico, USP	1,00
Agua purificada, USP	<u>75,25</u>
Total	100,00

El hidróxido sódico y el ácido clorhídrico se usan como soluciones al 10 % p/p para ajustar el pH al objetivo de 4,4. El metilparabeno y el propilparabeno se disuelven en glicerina calentada. La hidroxietilcelulosa se añade y se dispersa para formar una fase orgánica. El edetato disódico y el ácido cítrico se disuelven en agua purificada, el tenofovir se añade y se dispersa, el pH se ajusta a 4,4, y la solución se clarifica mediante el paso a través de un filtro de 0,22 μ m. Las fases acuosa y orgánica se mezclan, se agitan bien después de envasarse en tubos o aplicadores.

Seguridad y tolerabilidad

El gel vaginal de tenofovir usado al 1 % DVD (dos veces al día) era bien tolerado en hembra humanaes VIH (-) y VIH (+) abstinentes y activas sexualmente, con absorción sistémica limitada y con posibles efectos beneficiosos en la microflora vaginal.

PROCEDIMIENTO DE ESTUDIO

El objeto del estudio era evaluar la eficacia del gel de tenofovir cuando se aplicó por vía vaginal en la prevención de la transmisión del virus herpes simple, en particular el VHS-2.

El estudio era un ensayo de Fase IIb - de dos brazos, doble ciego, aleatorizado, controlado, que comparó el efecto de gel de tenofovir al 1 % con un gel placebo entre 889 mujeres sexualmente activas de edades comprendidas entre 18-40 años, con alto riesgo de infección por el VIH transmitido sexualmente.

- 5 El gel placebo (conocido como el gel placebo "universal") se formuló para minimizar cualquiera de los efectos posibles – negativo o positivo – en los puntos finales del estudio. Es isotónico para evitar la inflamación o deshidratación de la célula epitelial. Se formuló a un pH de 4-5 pero tiene una capacidad mínima de tamponamiento. Cuando se mezcló con un volumen igual de semen, el gel placebo indujo sólo una disminución insignificante en el pH del semen (de 7,8 a 7,7). El gel placebo contenía hidroxietilcelulosa (HEC) como un agente gelificante, y su viscosidad es comparable a la del gel de tenofovir. El gel no tiene propiedades anti-VIH o anti-VHS-2. El gel contenía ácido sórbico como conservante. El ácido sórbico no tiene actividad anti-VIH y es inmediatamente metabolizado por las células humanas. El gel placebo se formuló de la siguiente forma:

Nombre químico	% p/p	Cantidad
Agua purificada	96,34	674,4 litros
Cloruro sódico	0,85	6,545 kg
Hidroxietilcelulosa NF	2,7	20,79 kg
Ácido sórbico EP/NF	0,10	770,0 g
Hidróxido sódico NF (cs hasta pH 4.4)	0,0020	15,4 g
Hidróxido sódico NF	0,0080	61,6 g

- 15 Se formó a las participantes en los métodos adecuados de almacenamiento y aplicación del producto de estudio asignado. Se instruyó a las participantes para insertar una dosis (los contenidos completos de un aplicador) del producto en la vagina hasta 12 horas antes de cada acto de relación sexual vaginal (la relación sexual puede tener lugar inmediatamente después de la inserción del producto) e insertar una segunda lo antes posible tras la relación sexual, pero dentro de las 12 horas.

20 A las participantes del estudio se les aconsejó:

- Sólo aplicar el producto asignado por vía vaginal.
- No usar duchas vaginales o no limpiar la vagina, o insertar otros objetos o productos vaginales, durante 2 horas después de la inserción de gel.
- Si una mujer planeaba una ducha vaginal después del coito, se le recomendó insertar el gel después de la ducha vaginal.
- Almacenar adecuadamente sus productos de estudio (en un lugar fresco y seco fuera de la luz solar directa).
- Usar el producto de estudio tanto si se usa o no un preservativo.

30 Las participantes en el estudio completaron las visitas mensuales de seguimiento durante la duración de su participación, y se extrajo sangre al inicio del estudio, después, en los momentos pre-especificados durante el seguimiento y en la salida del estudio, con el fin de ensayar el VIH y el VHS-2.

35 Resultados

La presencia del VHS-2 se determinó en las muestras de sangre extraídas usando el tipo VHS-2 Kalon específico EIA (Kolon Biological Ltd., Reino Unido). En el inicio 454 de las 888 mujer no tenía sangre archivada para el ensayo) tenían la infección por VHS-2 preexistente que resultó en una prevalencia del 51,1 %. Las 434 mujeres restantes se consideraron como susceptibles para el VHS-2 a la entrada en el estudio, y el estado del VHS-2 a la salida se determinó en 426 de estas mujeres. Cabe señalar que 4 de estas mujeres no tenían archivada la muestra a la salida del estudio y 4 tenían resultados indeterminados de VHS-2 a la salida del estudio.

De las 205 mujeres que usaron la formulación de tenofovir durante la duración del estudio, 29 se infectaron con VHS-2.

45 De las 224 mujeres provistas con el placebo durante la duración del estudio, 58 se infectaron con el VHS-2. Así, el gel de tenofovir proporcionó una protección del 51 % frente al VHS-2

	Formulación de Tenofovir Nº. de participantes = 202	Placebo Nº. de participantes = 224
Nº. de infecciones por VHS-2	29	58
mujeres -años de seguimiento	293,3	287,3
Tasa de infección por VHS-2 por cada 100 mujeres	9,9	20,2

Aunque algunas realizaciones se han descrito en detalle anteriormente, los expertos en la técnica entenderán claramente que son posibles muchas modificaciones en las realizaciones sin apartarse del alcance de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. El compuesto antiviral ácido (R)-(1-(6-amino-9H-purin-9-yl)propan-2-ilo)metilfosfónico (tenofovir) para su uso en la reducción o la prevención de la transmisión del VHS-2 a un mamífero en donde el tenofovir se aplica por vía vaginal a una hembra humana como una formulación en gel, que comprende

Ingrediente	(% p/p)
Tenofovir	0,2-2,00
Hidroxietilcelulosa, NF (Natrasol®250H)	1-5,0
Propilparabeno, NF	0,01-0,10
Metilparabeno, NF	0,1-0,25
Edetato disódico, USP	0,02-0,10
Glicerina, USP	3,00-30,00
Ácido cítrico, USP	0,5-2,00
Agua purificada, USP	<u>hasta 100 %</u>

2. El compuesto antiviral ácido (R)-(1-(6-amino-9H-purin-9-yl)propan-2-ilo)metilfosfónico (tenofovir) para su uso en la reducción o la prevención de la adquisición del VHS-2 por un mamífero, en el donde el tenofovir se aplica por vía vaginal a una hembra humana como una formulación en gel, que comprende

Ingrediente	(% p/p)
Tenofovir	0,2-2,00
Hidroxietilcelulosa, NF (Natrasol®250H)	1-5,0
Propilparabeno, NF	0,01-0,10
Metilparabeno, NF	0,1-0,25
Edetato disódico, USP	0,02-0,10
Glicerina, USP	3,00-30,00
Ácido cítrico, USP	0,5-2,00
Agua purificada, USP	<u>hasta 100 %</u>

3. El compuesto antiviral para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde la formulación se aplica antes de la actividad sexual.

4. El compuesto antiviral para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde la formulación se aplica después de la actividad sexual.

5. El compuesto antiviral para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde la formulación se aplica tanto antes como después de la actividad sexual.

6. El compuesto antiviral para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde la formulación se aplica una vez o dos veces al día.

7. El compuesto antiviral para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde se añaden hidróxido sódico y ácido clorhídrico para ajustar el pH a 4,4.

8. El compuesto antiviral para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que la formulación comprende:

	% p/p
Tenofovir	1,00
Hidroxietilcelulosa, NF (Natrasol®250H)	2,50
Propilparabeno, NF	0,02
Metilparabeno, NF	0,18
Edetato disódico, USP	0,05
Glicerina, USP	20,00
Ácido cítrico, USP	1,00
Agua purificada, USP	<u>75,25</u>
Total	100,00

9. El compuesto antiviral para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde se añaden hidróxido sódico y ácido clorhídrico para ajustar el pH a 4,4.

10. El compuesto antiviral para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en que la formulación se aplica recubriendo un preservativo.