

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 933**

51 Int. Cl.:

A61K 39/21 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2009** **E 09151596 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015** **EP 2213299**

54 Título: **Composición de vacuna a base de un virus que presenta una proteína con uno o varios restos de dedo de zinc, su procedimiento de preparación y su utilización**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.02.2016

73 Titular/es:

VANDELDE, MICHEL (50.0%)
Avenue des Bouvreuils 14
1301 Bièrges, BE y
MARGER Y, HÉLÈNE (50.0%)

72 Inventor/es:

VANDELDE, MICHEL y
MARGER Y, HÉLÈNE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 558 933 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

Composición de vacuna a base de un virus que presenta una proteína con uno o varios restos de dedo de zinc, su procedimiento de preparación y su utilización

- 5 La presente invención se refiere a una composición para su utilización como vacuna, a base de al menos una cepa de virus que presenta al menos una proteína PZ con uno o varios restos de dedos de zinc, que comprende dichos virus en estado inactivado, estando estos virus enteros y presentando una envoltura viral intacta después de la inactivación (véase Mordock et al., *Journal of Virology*, Feb 2005, pp. 1533-1542, y su procedimiento de preparación.
- 10 Hasta la fecha se conoce un gran número de virus que presentan al menos una proteína con uno o varios restos denominados "de dedo de zinc". Estas proteínas se denominan abreviadamente proteínas PZ.
- Como virus que presentan dichas proteínas PZ, se pueden citar principalmente retrovirus, arenavirus, filovirus, hepatitis virus, papilomavirus y herpesvirus. Entre las proteínas PZ conocidas llevadas por estos virus se pueden citar, entre otras las proteínas NCp7, Tax, NS5A, VP30, IE63, ORF4, UL69, BMLF1, U42, ORF57, ORF3, BICP27, UL54, M69, Z y E6.
- 15 La estructura de dedo de zinc de estas proteínas PZ es indispensable de una u otra manera para la replicación de los virus patógenos que las contienen. Por tanto, estas proteínas representan una diana de elección para moléculas capaces de expulsar átomos de zinc, porque se produce entonces una modificación irreversible de su estructura que inactiva el virus atacado y abole completamente su poder infeccioso.
- 20 Se han analizado numerosas moléculas y han demostrado un poder de expulsión de átomos de zinc fuera de las estructuras de dedos de zinc de las proteínas PZ, principalmente la proteína NCp7 del virus VIH. Estas moléculas están enumeradas, por ejemplo, en la solicitud de patente WO 2003/060098 y una de ellas es la azodicarbonamida (ADA) (véase también WG Rice et al., *Nature Medicine* 3, 341-345 (1997)).
- 25 La azodicarbonamida (= azobisformamida) se conoce desde hace mucho tiempo (1892) en forma de una sustancia química cristalina (véase The Merck Index 13^{ed} Ed., 2001, p. 918). Esta sustancia es poco soluble en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos, con la excepción de N,N-dimetilformamida y dimetilsulfóxido (DMSO). Por ADA se entiende en el sentido de la presente invención, cada uno de los isómeros cis y trans de esta sustancia, así como su mezcla racémica.
- Esta sustancia se utilizó como adyuvante en harina alimenticia y como agente de hinchamiento en la fabricación de productos plásticos y de caucho.
- 30 La actividad potencial de ADA se observó durante algún tiempo en diversos campos terapéuticos, en particular como agente terapéutico activo contra infecciones virales, ciertas afecciones cancerosas y trastornos resultantes de una producción patológica de citoquinas (véase, por ejemplo los documentos de patentes europeas EP-B-0524961, EP-B-0941098, EP-B-1032401 y el documento de patente US-A-5585367). Esta actividad se reveló igualmente frente al virus del SIDA (véase por ejemplo Vandeveld M. et al., *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1996, 12, 567 o Erik De Clercq, Institute for Medical Research, KUL, Leuven 2001).
- 35 Otras investigaciones han demostrado la actividad de ADA contra los arenavirus (véase, por ejemplo, C.C. García et al., *J. Gen. Virol* 2006 May 87 (Pt 5): 1217-1228), herpesvirus (véase por ejemplo el documento WO 2003/060098), virus de la estomatitis vesicular VSV (véase el documento US-A-5585367), numerosos retrovirus (véase Rice WG, *Conf. Retroviruses Opportunistic Infect.*, Jan 1997), virus responsables del cáncer de cuello uterino (seres humanos) VPH (véase Beerheide W., *Journal of the National Cancer Institute*, July 21, 1999), virus que provocan inmunodeficiencia en el mono macaco y en chimpancés (VIS) (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases* [NIAID] HIV/OI Searchable Chemical Database http://chemdb2.niaid.nih.gov/struct_search/all/url_search.asp?aids_no=029805).
- 40 Numerosos investigadores también se han implicado en la investigación de vacunas para combatir las infecciones causadas por estos virus portadores de proteínas PZ, en particular en el campo de la vacunación contra la inmunodeficiencia humana.
- 45 En la patente EP-B-0658119, se propone utilizar péptidos procedentes de cepas naturales del virus VIH para constituir vacunas terapéuticas y profilácticas. Sin embargo, estas proteínas separadas de su soporte membranal viral no poseen la actividad antigénica buscada. Según la solicitud de patente WO 2005/076001, se propone utilizar un polipéptido derivado de la proteína GP41, que da lugar al mismo inconveniente que en la propuesta anterior. Por otra parte, se ha observado que los virus inactivados por formaldehído o por la acción del calor no inducían, en preparaciones de vacunas, más que una respuesta modesta en términos de anticuerpos debido a la modificación de las proteínas inmunogénicas de la envoltura viral.
- 50

En la solicitud de patente US-A-2003/228329 se describe el desarrollo de un vector viral (adenovirus) que lleva restos de VIH. Desafortunadamente, fueron decepcionantes los datos de los ensayos clínicos con la vacuna experimental.

5 En la solicitud de patente WO 2006/038124, se preveía una composición que contenía un virus VIH entero, inactivado por un tratamiento químico con alditol-2 (AT-2), utilizándose esta composición en la preparación de una vacuna. El propósito de este tratamiento era inactivar el virus manteniendo al mismo tiempo la estructura natural de sus proteínas. Sin embargo, se sabe que el AT-2 es capaz de crear puentes de disulfuro entre los cromosomas de células linfocitarias humanas. Por otro lado, durante la inactivación del virus VIH, el AT-2 se descompone en 2-tiopiridona que se comporta de forma impredecible con los grupos SH de las otras proteínas.
10 Estudios espectrofotométricos han demostrado que la 2-tiopiridona se asocia de forma no covalente con proteínas que llevan grupos SH, reducidos o no.

Por último, cabe señalar que el experto en la técnica se enfrenta a una dificultad particular. Se deduce de un análisis efectuado por el laboratorio molecular del *National Institute for Health* (NIH) de Estados Unidos que el genoma humano contenía informaciones muy útiles para la producción de varios centenares de proteínas con uno o varios restos de dedos de zinc.
15

El problema a resolver es pues cuádruple: Es necesario proporcionar una composición en la que el virus esté inactivado, y por lo tanto, haya perdido su poder infeccioso, permitiendo dicho virus sin embargo simultáneamente la estimulación de anticuerpos por el sujeto al que se administra la composición. Además, la composición debe ser completamente aceptable en términos de toxicidad y el tratamiento de inactivación del virus debe presentar criterios estrictos de selectividad, es decir, no debe tener consecuencias para las proteínas PZ útiles del sujeto al que se administra la composición.
20

Para resolver este problema, se ha previsto según la invención, una composición de vacuna a base de al menos una cepa de virus que presenta al menos una proteína PZ con uno o varios restos de dedo de zinc, caracterizada por que dicho zinc de dicha proteína PZ ha sido expulsado de dicha al menos una proteína PZ por una reacción de oxidorreducción con azodicarbonamida y por que dicha composición comprende además biurea formada a partir de la azodicarbonamida en el curso de dicha reacción de óxidorreducción, así como posiblemente un remanente de azodicarbonamida sin reaccionar
25

Por virus entero es necesario entender, en el sentido de la presente invención, que el virus inactivado contiene todavía la totalidad de su envoltente o membrana viral, su nucleocápsida y su material genético. Por envoltente o membrana viral intacta, se entiende que las proteínas que la constituyen no fueron ni química ni físicamente modificadas por la inactivación, y por tanto, que los restos antigénicos que llevan estén inalterados, presentando la envoltente viral una conformación y una actividad fusiogénica conservadas.
30

Una medida del estado de inactivación del virus se puede efectuar de acuerdo principalmente con la enseñanza, contenida en el texto "*HIV: A Practical Approach*" de Jonathan Karn, publicado por Oxford University Press, 1995, pp.120-125.
35

En esta aplicación lo importante es precisar el poder contaminante del virus después del tratamiento.

El título inicial del virus se expresa como el número de dosis infecciosas (número predeterminado de partículas infecciosas para cada especie) para un cultivo por mililitro de plasma.

40 Para esto se utilizan habitualmente diluciones en serie y se comprueba después en cada dilución el poder contaminante de los virus sobre cultivos de células humanas hasta que la dilución ya no permite obtener una dosis de virus suficiente para la infección.

Los resultados se expresan en DICT₅₀ (dosis infecciosa en cultivo de tejidos para el 50% de los pocillos). Una DICT₅₀ en el caso del virus VIH, es aproximadamente equivalente a una partícula viral por mL de plasma.

45 Teniendo en cuenta las reducciones de los títulos obtenidos en los diferentes experimentos fue posible determinar la dosis de reducción decimal (D10). Una cantidad de 3 µg/mL de ADA disminuye en 100.000 veces el título infeccioso (reducción: 5 log (más poder infeccioso detectado) después de 2 horas de exposición a 37°C.

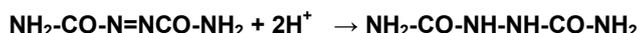
Ventajosamente, la inactivación se realiza con ayuda de ADA micronizada. Por ADA micronizada, se entiende que esta sustancia se presenta en forma de partículas de un tamaño suficientemente pequeño para poder atravesar la envoltente viral sin necesitar una disolución en un vehículo y esto de manera que se mantenga la envoltente viral intacta. Sin embargo, la ADA micronizada puede penetrar en el virus estando en suspensión y parcialmente en solución en la fase acuosa del medio de cultivo de este último, lo que permite no tener que introducir en la composición disolventes farmacéuticamente poco recomendables, cuando no inaceptables. De hecho, del DMSO utilizado hasta ahora en experimentos sobre virus con ADA se sabe que es capaz de interactuar con las proteínas de la membrana del virus (Tjernberg et al., *J. Biomol. Screen*, 2006), también se sabe que es un agente
50

que desestructura eficazmente las membranas celulares para favorecer la penetración de un medio dado en su interior. Esta es entre otras una de las razones por la que es ampliamente utilizado como vehículo para numerosos medicamentos que deben pasar por vía transmembranal. Es aceptable una utilización de DMSO a una concentración igual o inferior a 0,5%, preferiblemente inferior a 0,3% en volumen.

- 5 Según una forma de la invención, la azodicarbonamida micronizada se presenta en forma de partículas que están desprovistas de aditivo, es decir, en particular, sin adyuvante tensioactivo ni recubrimiento, y que presentan un tamaño inferior a 10 µm, preferiblemente a 8 µm, en particular a 5 µm. Ventajosamente, dichas partículas presentan un tamaño medio d_{50} inferior a 2 µm y un d_{90} inferior a 4 µm.

10 Esta estrecha granulometría permite una reproducibilidad muy acusada de los resultados obtenidos. Se puede por ejemplo preparar una ADA de este tipo según la enseñanza de la solicitud de patente WO 2007/048820.

Durante la reacción de oxidorreducción antes mencionada la ADA en presencia de protones procedentes de proteínas PZ se descompone en biurea de la siguiente manera:



15 Por ejemplo, en el caso del virus VIH y de su proteína de la nucleocápsida, NCp7, que comprende un dedo de zinc, la ADA penetra en las partículas virales a través de la envoltente del retrovirus e interactúa con la proteína NCp7 (véase Rice WG et al.; *Nat. Med.* March 1997).

20 La proteína NCp7 contiene dos copias de un fragmento peptídico que presenta la siguiente secuencia: Cys-X2-Cys-X4- His-X4-Cys (también llamado abreviadamente CCHC) coordinado con un ion metálico de zinc (II). De esto resulta una conformación tridimensional de la proteína NCp7 con dos dedos de zinc. Cada dedo de zinc presenta tres enlaces Zn-S y un enlace Zn-N, contribuyendo los cuatro a la conformación tridimensional de los dedos de zinc.

25 Al ser la azodicarbonamida un donador de electrones gracias a su enlace N=N, permite desestabilizar el enlace Zn-S. Esto da como resultado la formación de un puente disulfuro entre los dos átomos de azufre adyacentes de la estructura tridimensional y la eliminación de un grupo molecular tiolato correspondiente, fuera del sitio de enlace al ion metálico, así como una expulsión del zinc.

Después de haber dado sus electrones del enlace N=N la azodicarbonamida se reduce a biurea por aceptación de dos protones, que transforman el grupo -N=N- en un grupo -NH-NH-.

30 En este contexto, las reacciones de ADA con NCp7 conducen a una desestabilización de la esfera de coordinación del zinc en la NCp7 que va seguida por la inhibición del VIH (I. A. Topol et al., *J. Phys. Chem. B* 2001, 105, 11341-11350).

La proteína NCp7 es crítica para la replicación viral y, por lo tanto, la modificación de su conformación tridimensional ya no permite a la proteína NCp7 reconocer la enzima transcriptasa inversa (RT) y ya no es posible la replicación del virus.

35 Puesto que la azodicarbonamida no tiene más que un efecto sobre la proteína NCp7 que se encuentra en la nucleocápsida de las partículas virales del virus VIH, se conserva la conformación inicial del virus (exterior y general), así como la actividad fusiónica de la proteína de la envoltente GP120 al mismo tiempo que el zinc es expulsado de la proteína PZ desprotonizada.

Un fenómeno similar se ha observado en otras proteínas, tales como las proteínas E6, NS5A, IE63 durante la acción de la ADA, entre otros sobre los virus VPH, VCH y VSH.

40 La biurea es el único catabolito de la ADA *in vivo* (*Concise International Chemical Assessment Document 16*; Organización Mundial de la Salud: Ginebra, 1999). Además, en las condiciones experimentales correspondientes al cuerpo humano (pH neutro, temperatura de 37°C, medio sérico humano) parecía que la reacción antes indicada era irreversible. Por otra parte, está actualmente verificada la transformación rápida de la ADA en biurea en presencia de células o de sangre y de ello se puede deducir que el remanente de ADA sin reaccionar durante
45 la oxidorreducción se va descomponer en biurea en muy poco tiempo y de manera irreversible en el cuerpo del sujeto al cual se ha administrado la composición. Tan pronto como ha tenido lugar esta rápida descomposición del remanente de ADA en biurea, ya no subsiste de la composición administrada ningún agente susceptible de interactuar con las proteínas PZ útiles que están presentes en el cuerpo del sujeto tratado. Finalmente, parecía después de múltiples ensayos con animales y con voluntarios sanos, que la absorción de la ADA y de biurea no
50 podía poner de manifiesto los problemas de toxicidad o de tolerancia más que a concentraciones anormal e inútilmente elevadas. Actualmente se dispone de datos toxicológicos de la azodicarbonamida, concernientes en particular a su único catabolito, la biurea, que son suficientes para la administración a voluntarios sanos o enfermos.

5 La composición según la invención comprende por lo tanto, además de virus completos inactivados en los que el zinc ha sido expulsado de dicha al menos una proteína PZ y la envoltura viral está intacta, biurea así como posiblemente, un remanente de azodicarbonamida en exceso y que por lo tanto no ha reaccionado. La biurea se encuentra dentro de la envoltura viral, puesto que en la composición según la invención, la ADA penetra fácilmente dentro de ella para ser allí reducida. Sin embargo, la ADA en exceso, puede encontrarse incluso en el exterior y/o interior de las envolturas virales.

10 Según una forma de realización ventajosa de la invención, la composición contiene además un donador de protones farmacéuticamente compatible, en un estado desprotonizado que es también farmacéuticamente compatible y que resulta de una reacción de oxidorreducción adicional con dicho remanente de azodicarbonamida sin reaccionar, así como posiblemente un resto del donador de protones sin reaccionar.

15 Con el fin de evitar la presencia incluso temporal de la ADA en el cuerpo del sujeto tratado, y de impedir por tanto cualquier riesgo de ataque de proteína PZ útil para un remanente de ADA en la composición según la invención, se introduce en la misma, antes de la administración, dicho donador de protones en una cantidad suficiente para descomponer el remanente de ADA en biurea. La composición de vacuna de la invención está entonces desprovista de ADA. Ventajosamente, el donador de protones es un reductor fisiológico, preferiblemente una proteína que exhibe al menos un grupo sulfhidrilo libre, elegida por ejemplo, del grupo que consiste en cisteína, glutatión, fosfato de nicotinamida y sus derivados y mezclas, y en el que el donador de protones desprotonizado es respectivamente cistina, glutatión oxidado o NADP⁺ (forma oxidada del fosfato de nicotinamida) o uno de sus derivados.

20 Preferiblemente, el donador de protones es cisteína o uno de sus derivados, por ejemplo, N-acetil-L-cisteína, y el donador de protones desprotonizado es cistina o uno de sus derivados. La cisteína y la cistina son aminoácidos bastante corrientes en proteínas del cuerpo humano o animal y por lo tanto no presentan ningún peligro en términos de toxicidad y tolerancia.

25 Según incluso otra forma de realización de la invención, la composición contiene además al menos un adyuvante farmacéuticamente aceptable, tal como el adyuvante completo o incompleto de Freund, alumbre o incluso otros compuestos tales como los descritos en el trabajo de Vermont et al., *Ann. Méd. Vét* 2003, 147, pp. 393-401.

De esta manera, la composición de vacuna según la invención es susceptible de desencadenar una respuesta inmunitaria mejorada por la presencia de adyuvantes, cuando se administra a un paciente.

30 En una forma de realización ventajosa, la composición de vacuna de la invención comprende además células inmuno-competentes aisladas que tienen posiblemente al menos parcialmente internalizados dichos virus inactivados.

35 Por células inmunocompetentes se puede entender según la invención, por ejemplo células dendríticas, maduras o inmaduras, células de Langerhans, fagocitos (monocitos y macrófagos) o incluso células endoteliales o epiteliales que expresan moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CMH) de clase 2. Estas células pueden estar en varios estados de diferenciación conocidos *per se* que no se detallarán en la presente memoria.

En el sentido de la invención, cuando la composición de vacuna según la invención comprende además células inmunocompetentes aisladas, es posible que los virus inactivados se encuentren en dichas células inmunocompetentes aisladas, si ya ha tenido lugar la internalización del virus, o no se encuentran todavía en estas células si esta internalización todavía no se ha producido

40 La presente invención se refiere además a un procedimiento de preparación de una composición según la invención, que comprende:

- Una puesta en contacto de al menos una cepa de virus que presenta al menos una proteína PZ con uno o varios restos de dedo de zinc con azodicarbonamida micronizada,
- Una penetración de la azodicarbonamida micronizada a través de la envoltura viral de dicho virus
- 45 dejándola intacta y
- Una inactivación de los virus por una reacción de oxidorreducción entre la azodicarbonamida micronizada y dicha al menos una proteína PZ, que da como resultado la expulsión del zinc de dicha proteína PZ y a una descomposición al menos parcial de la azodicarbonamida en biurea.

Según una realización preferida de realización de la invención, este procedimiento comprende además,

- 50 – Una puesta en contacto de los virus inactivados con un donador de protones farmacéuticamente aceptable, que también es farmacéuticamente aceptable en el estado desprotonizado, y

- Una reacción de oxidorreducción adicional entre el donador de protones y un posible remanente de de azodicarbonamida sin reaccionar, lo que desprotoniza dicho donador de protones y descompone dicho remanente de biurea.

5 Según que un modo ventajoso de realización del procedimiento, éste comprende además una eliminación del zinc expulsado, por cualquier medio adecuado conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo por centrifugación. Se puede prever a continuación un aislamiento de los virus inactivados, por cualquier medio adecuado conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo por ultracentrifugación, de modo que se elimine al máximo de la composición cualquier componente distinto de los virus inactivados.

10 En una forma ventajosa del procedimiento según la invención, el procedimiento comprende además una impulsión de células inmunocompetentes aisladas por dicha composición que contiene virus inactivados por azodicarbonamida, un cultivo *ex vivo* de las células impulsadas y una expresión en su superficie de los antígenos específicos de dichos virus inactivados.

15 La invención se refiere también a la utilización de una composición de vacuna según la invención como vacuna profiláctica o terapéutica contra al menos una infección por al menos no de dichos virus que presentan al menos una proteína con uno o varios dedos de zinc. La vacuna producida se administra ventajosamente por inyección o por vía transmucosal, oral, genital o rectal.

La composición según la invención o producida por un procedimiento de acuerdo con la invención se puede utilizar tal cual como vacuna. El virus inactivado puede ser autólogo o no. La vacuna puede estar formada también por un cóctel de diferentes virus inactivados.

20 Una vacuna terapéutica a base de virus inactivado, preferiblemente autólogo, y que presenta según la invención una conformación intacta permite amplificar, por el virus inactivado, la respuesta inmunitaria deficiente de un paciente frente a la infección y por lo tanto luchar eficazmente contra dicha infección, puesto que los componentes del sistema inmunitario que podrán luchar eficazmente contra el virus inactivado podrán luchar igualmente contra el virus activo.

25 La vacuna profiláctica es en sí misma más bien preventiva y su objetivo principal es inducir la producción por el organismo de anticuerpos y células citotóxicas dirigidas hacia los elementos que tengan el resto antigénico. Por tanto, es esencial que los restos antigénicos del virus inactivado de la vacuna según la invención se conserven después de tratamiento de inactivación para asegurar que las defensas inmunitarias orientadas hacia sus restos antigénicos específicos puedan reconocer también los restos antigénicos de los virus infecciosos y neutralizar así
30 la infección por este mismo virus por la cascada del complemento del sistema inmunitario y/o por la destrucción de las células infectadas que presentan en su superficie dichos restos antigénicos gracias a los linfocitos citotóxicos (LCT).

Ventajosamente, la vacuna producida es una vacuna administrable por inyección lo que permite intensificar las defensas de la persona ya portadora del virus o por vía transmucosal, oral, genital o rectal.

35 La inducción de una fuerte respuesta inmunitaria en la vía de entrada al encuentro con el agente infeccioso parece ser la vía más adecuada para prevenir una infección por los agentes virales, el virus del papiloma humano, de la hepatitis, VIH, herpes etc. Por lo tanto, la estrategia que permite inducir una respuesta inmunitaria protectora al nivel de la mucosa es un aspecto crítico del desarrollo de nuevas vacunas.

40 Óvulos vaginales preparados según las reglas farmacéuticas (pH, tiempo de disolución, color, perfume), así como supositorios específicos para la protección de la mucosa tienen más probabilidades de ser protectores. En combinación con una administración por inyección subcutánea la vía mucosal es la más próxima al fenómeno fisiológico infeccioso..

45 La utilización según la invención puede por lo tanto comprender un impulso de células inmunocompetentes aisladas, tomadas previamente de un sujeto portador del virus o de un sujeto sano, por dicha composición que contiene virus inactivados por azodicarbonamida, un cultivo *ex vivo* de las células impulsadas, en presencia principalmente de citoquinas de activación, y una expresión en su superficie de los antígenos específicos de dicho virus inactivados.

50 Las células inmunocompetentes así cultivadas *ex vivo* en presencia de virus inactivado según la invención internalizan el virus inactivado y se denominan entonces cargadas o estimuladas y listas para ser reinyectadas por vía de administración subcutánea, intradérmica o intralinfática. Estas células inmunocompetentes se activan preferiblemente por la acción de citoquinas y expresan en su superficie antígenos (péptidos) específicos del virus inactivado internalizado que les ha permitido estimularlas.

Las células inmunocompetentes actúan sobre los linfocitos T citotóxicos (Tc) y T auxiliares (Th) activándolos y teniendo una papel sobre su proliferación gracias a una cascada de reacciones de la respuesta inmunitaria

desencadenada por una multitud de moléculas expresadas por células inmunocompetentes. Estas células son entonces excelentes células activadoras específicas de los linfocitos T citotóxicos del virus inactivado según la invención, por ejemplo para un paciente sano, pero también para un paciente infectado.

5 En el caso de sujetos infectados, existe un efecto de amplificación de la reacción inmunitaria frente al virus inactivado según la invención, que permite igualmente luchar contra la infección presente. De hecho, en el portador del virus o paciente infectado, las células dendríticas están generalmente en número reducido y la mayor parte del tiempo, estas células inmunocompetentes ya son portadoras de virus infecciosos. La utilización de células dendríticas previamente tratadas con la composición de vacuna según la invención permite introducir células inmunocompetentes que no están infectadas y que permiten amplificar por el virus inactivado la respuesta inmunitaria frente a dicho virus activo.

10 Es por esto, por lo que en el caso del virus VIH, las células dendríticas se obtienen de monocitos que no presentan receptores CD4 (vía de entrada para el virus). Por tanto, estas células son sanas y por una cascada de estimulación, los monocitos se diferencian a continuación en células dendríticas sanas que luego se cargarán con virus inactivado.

15 La invención se refiere igualmente a un método de tratamiento de un individuo infectado con un virus que presenta al menos una proteína PZ con uno o varios restos de dedo zinc, comprendiendo dicho método una administración, en forma de una vacuna terapéutica, de una composición según la invención o de células inmunocompetentes tratadas con una composición según la invención.

20 Se puede prever también de acuerdo la invención un método de tratamiento de un individuo sano que comprende una administración, en forma de una vacuna profiláctica, de una composición según la invención o de células inmunocompetentes aisladas tratadas con una composición de vacuna según la invención.

Otras particularidades relativas a la composición, el procedimiento y la utilización de la invención se indican en las reivindicaciones.

25 La invención se describirá con más detalle con ayuda de los ejemplos que figuran a continuación y con referencia a la única figura anexa de dibujos, que ilustra la evolución de la concentración media en plasma de biurea en el curso del tiempo.

Ejemplos

En los ejemplos, la azodicarbonamida utilizada fue producida según el protocolo descrito en la solicitud de patente WO 2007/048820 a nombre de la firma solicitante.

30 **Ejemplo 1.- Análisis de la toxicidad de la ADA y de la biurea (BIU) obtenida durante la degradación de la ADA.**

Antes de poder determinar la toxicidad de los compuestos, se trata de validar un método de valoración de la biurea.

1.1 Método de valoración

35 El método siguiente de determinación de las proporciones de biurea en muestras de plasma heparinizado, así como en muestras de orinas para concentraciones que varían de 0,2 a 20 µg/mL se consideró de acuerdo con las recomendaciones de la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos), con las buenas prácticas de laboratorios (GLP) y con el libro "*Guidance for Industry: Bionalytical Method Validation*".

40 Los productos de separación (analitos) de las muestras de plasma u orina se detectan por espectrometría de masas (MS-MS). El límite inferior de detección (LOQ) de la biurea es 0,2 µg/mL, mientras que el límite superior de la degradación (LOD) es 20 µg/mL. Las curvas de calibrado son lineales de 0,2 a 20 µg/mL con un coeficiente de determinación (r^2) de 0,99.

No apareció ninguna variación de concentraciones de biurea en las muestras de plasma o de orina después de 55 horas de conservación a temperatura ambiente.

45 Las concentraciones iniciales de biurea se encuentran en muestras de plasma o de orina conservadas a -20° C durante 3 meses, y pueden experimentar al menos tres ciclos de congelación/descongelación.

1.2.- Transformación de ADA en BIU

50 La rápida transformación de la ADA en BIU en presencia de células o sangre es conocida desde mucho tiempo y se confirmó en ensayos con diferentes componentes sanguíneos expuestos a ADA radiomarcada. Sólo se encontró BIU como derivado de esta ADA radiomarcada.

Además, dosis crecientes de azodicarbonamida en suspensión en un hidrogel de carboximetilcelulosa (CMC) al 0,5% se administraron por vía oral a grupos de 3 ratones (peso medio: 20 g). Un grupo de control recibió el vehículo CMC y las muestras de sangre se tomaron 30, 60 y 120 minutos después de la administración.

Tabla 1

Grupo	[ADA] administrada	[ADA] después de 30 minutos	[ADA] después de 60 minutos	[ADA] después de 120 minutos	[BIU] después de 60 minutos
1	1,25 mg, es decir 62,5 mg/kg	nada	nada	nada	3 µg/mL
2	2,50 mg, es decir 125 mg/kg	nada	nada	nada	5 µg/mL
3	5,00 mg, es decir 250 mg/kg	nada	nada	nada	8 µg/mL
4	10 mg, es decir 500 mg/kg	nada	nada	nada	10 µg/mL
5	0 mg	nada	nada	nada	nada

5

A continuación, se realizó el mismo ensayo en ratas para determinar si la conversión de ADA en biurea era diferente en función del sexo del animal y no se observó ninguna diferencia debida al sexo.

1.3 Precauciones previas: ensayos preclínicos

10 En la fase preclínica se llevaron a cabo muchos ensayos de azodicarbonamida con referencia en cada caso a un grupo de control que recibió sólo el vehículo y se pudieron extraer las conclusiones siguientes:

1. No se observaron diferencias significativas entre los animales tratados y de control en materia de peso corporal, siendo idénticas la cantidad de alimentos absorbidos por los animales.
2. Se vigiló la toxicidad ocular para descartar un posible depósito de cristales de BIU y no se observaron diferencias entre los grupos tratados y de control.
- 15 3. Puesto que las proteínas con un resto de dedo de zinc pueden desempeñar un papel en la aparición de la diabetes, en particular la proteína "ZAC", se estudiaron los efectos sobre los índices de glucosa en sangre y de insulina durante este período. El ensayo de tolerancia a la glucosa no difería entre el grupo ADA y el grupo de control tanto en lo que se refiere a las valoraciones de glucosa como de insulina.
- 20 4. Puesto que el aparato reproductor de los mamíferos es extremadamente sensible a todas las proteínas PZ, un estudio preclínico analizó igualmente el índice de fertilidad (número de informes necesarios para lograr la fecundación), el índice de gestación (número de individuos por camada), el índice de supervivencia (número de individuos recién nacidos que sobreviven cuatro días o más), el índice de lactancia (número de individuos nacidos que sobreviven cuatro días o más en la camada conservada) y esto para tres generaciones. No se observaron efectos en materia de reproducción.
- 25 5. Igualmente se evaluó el efecto de la ADA que implicaba una concentración de BIU en sangre superior a 20 µg/mL sobre la presión arterial, la frecuencia cardíaca y el electrocardiograma. Las concentraciones en sangre de BIU superiores a 20 µg/mL no inducían ninguna diferencia significativa sobre los parámetros estudiados.
- 30 6. También se evaluó el efecto de la ADA que implicaba una concentración en sangre de BIU superior a 20 µg/mL sobre la presión arterial y el sistema respiratorio (frecuencia, máximo volumen de inspiración, máximo volumen de espiración, tiempo de inspiración y expiración, variación de volumen después de la administración de dosis crecientes de ADA). Estas dosis no inducen ninguna diferencia significativa en los parámetros estudiados.
- 35 7. Se evaluó en el sistema nervioso central el efecto de la ADA que implicaba una concentración de BIU en sangre superior a 20 µg/mL (límite de detección del método) por la batería de observaciones estandarizadas "Irwin", así como la temperatura corporal. Estas concentraciones de BIU en sangre no inducían diferencias significativas en los parámetros estudiados.
8. Se midieron las interacciones potenciales de la BIU con el citocromo P450 3A humano y la BIU no inhibió ninguna de las enzimas citocromo P450 3A(CYP3A) hasta una dosis de 100 µM.

9. Se analizó igualmente la biurea en el contexto de un ensayo de mutación inversa de cepas de *Salmonella typhimurium* H-histidina y *Escherichia coli* WP2 (uvrA) (pK101). Los resultados fueron negativos.

1.4 Estudio del efecto de dosis únicas y crecientes en voluntarios humanos sanos

5 El método de valoración de biurea (BIU) en sangre ha sido validado para concentraciones superiores a 20 µg/mL por dilución en serie.

La farmacocinética de la biurea (BIU), como marcador después de la ingestión de dosis crecientes de azodicarbonamida (ADA), se estudió en 18 voluntarios sanos (sexo masculino: edades de 18 a 45 años) divididos en varios grupos de los cuales dos grupos ingirieron placebo.

10 Durante el primer período, los voluntarios se dividieron en grupos de 6 personas (4 con ingrediente activo, 2 con placebo por grupo) que recibieron: Grupo A, una dosis de 150 mg (2,15 mg/kg); Grupo B, una dosis de 600 mg (8,5 mg/kg); Grupo C una dosis de 3000 mg (42,5 mg/kg).

Durante el segundo periodo (7 días sin tratamiento ("wash-out")) dichos voluntarios fueron divididos en grupos de 6 personas (4 con ingrediente activo, 2 con placebo por grupo) que recibieron: Grupo A1, una dosis de 300 mg (4,3 mg/kg); grupo B1 una dosis de 1200 mg (17 mg/kg); grupo C1 una dosis de 6000 mg (85 mg/kg).

15 Como se puede ver en la figura, se alcanzaron las concentraciones plasmáticas máximas individuales de BIU a las 4 horas después de la toma de la dosis, con valores de «t_{max}» medio entre 2,1 y 3,2 horas para niveles de dosis diferentes; el tiempo de separación y la diferencia entre el tiempo de la ingestión y el tiempo de concentración máxima disminuyen con la importancia de la cantidad de ADA absorbida.

Los valores medios de la concentración máxima de BIU en sangre se ilustran en la Tabla 2

20 **Tabla 2**

Grupo	Concentración máxima de BIU en sangre
A (150 mg de ADA)	0,648 µg/mL
A1 (300 mg de ADA)	1,556 µg/mL
B (600 mg de ADA)	2,144 µg/mL
B1 (1200 mg de ADA)	4,89 µg/mL
C (3000 mg de ADA)	5,182 µg/mL
C1 (6000 mg de ADA)	8,995 µg/mL

25 La biurea en la concentración sérica dentro de los límites de 0,648 µg/mL a 8,995 µg/mL fue muy bien tolerada y ha demostrado ser segura después de la evaluación de los datos clínicos y de laboratorio, incluyendo los valores de metahemoglobina, los signos vitales, comprendiendo electrocardiogramas (espacio QT) y todos los datos analíticos relativos a la función renal.

La incidencia de efectos secundarios es la misma que en el grupo placebo.

Ejemplo 2.- Irreversibilidad de la reacción de reducción de la azodicarbonamida a biurea

Se evaluó por voltametría cíclica el comportamiento redox de la ADA y la BIU a niveles de electrodos sólidos.

30 La BIU se oxida en medio ácido a potenciales positivos bastante elevados (superiores 1 voltio respecto a Ag/AgCl KCl 3M) con producción de ADA, mientras que la ADA es reducible a pH neutro a potenciales próximos a 0,2 V a Ag/AgCl KCl 3 M.

35 La biurea se puso en contacto con sistemas oxidantes experimentales de peroxidasa de rábano silvestre (HRP)/H₂O₂, mieloperoxidasa/Cl⁻/H₂O₂, y citocromo P450/NADH para estudiar la re-oxidación posible de la biurea en azodicarbonamida. Las mediciones se llevaron a cabo con las enzimas libres en solución, pero igualmente con las enzimas inmovilizadas en un electrodo sólido.

En las siguientes condiciones experimentales: pH neutro, 37°C y medio sérico humano, la transformación de ADA en BIU es irreversible, incluso en presencia de las enzimas antioxidantes más potentes.

Ejemplo 3.- Degradación de ADA en BIU por adición de un donador de protones.

Se explotó la electro-actividad de ADA (0,2 V) en electrodos sólidos con el fin de seguir, en tiempo real, por un crono-amperímetro, su rápida desaparición en contacto con un fluido biológico.

5 No siendo perturbada la medición electroquímica por la turbidez del medio (plasma, cultivo celular), fue posible trabajar directamente con muestras biológicas sin su tratamiento (más que una simple dilución). Un electrodo de carbono vítreo polarizado a -0,2 V situado en el medio de medición permitió el seguimiento crono-amperométrico de la ADA.

10 Las sustancias que consumen ADA provocan una caída de la corriente de reducción. Esta caída de corriente es proporcional al compuesto añadido. Se estudió el efecto de una serie de agentes reductores fisiológicos: un derivado de cisteína, N-acetil-cisteína, fosfato de nicotinamida y glutatión.

3.1 Efecto de las sustancias reductoras sobre la concentración de ADA

15 Como se acaba de mencionar anteriormente, las sustancias que consumen ADA provocan una caída de corriente de reducción proporcional al compuesto añadido. En la Tabla 3, se recogen los efectos de la cisteína, más particularmente un derivado de la cisteína, N-acetil-cisteína y glutatión.

Se utilizó un tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4 para realizar las mediciones amperimétricas y una concentración de ADA de $2 \cdot 10^{-5}$ molar. A continuación se añadieron concentraciones crecientes de cisteína y glutatión para obtener respectivamente una concentración final de $1 \cdot 10^{-5}$ molar, $2 \cdot 10^{-5}$ y $3 \cdot 10^{-5}$ molar de cisteína y glutatión.

20

Tabla 3

Composición	Corriente de reducción (después de 1 minuto)	Composición	Corriente de reducción (después de 1 minuto)
PBS sola (control negativo)	0,15 mA	PBS sola (control negativo)	0,05 mA
PBS + ADA (control positivo)	0,6 mA	PBS + ADA (control positivo)	0,42 mA
PBS + ADA + $1 \cdot 10^{-5}$ molar de Cys	0,4 mA	PBS + ADA + $1 \cdot 10^{-5}$ molar de GSH	0,27 mA
PBS + ADA + $2 \cdot 10^{-5}$ molar de Cys	0,25 mA	PBS + ADA + $2 \cdot 10^{-5}$ molar de GSH	0,17 mA
PBS + ADA + $3 \cdot 10^{-5}$ molar de Cys	0,17 mA	PBS + ADA + $3 \cdot 10^{-5}$ molar de GSH	0,10 mA

Sorprendentemente, es la adición de cisteína la que da como resultado la reducción más rápida y más fuerte de ADA a BIU (H-PharULB-Institut de Pharmacie Prof. Kauffman 2007).

3.2 Efecto de la cisteína sobre ADA en condiciones fisiológicas "in vitro"

25 Se utilizó un tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4 para realizar las mediciones amperimétricas y la concentración de ADA 10^{-3} molar. Con el fin de reproducir en las mejores condiciones el medio sanguíneo en el cual se degrada rápidamente ADA de manera natural, se añadieron 50 μ L de glóbulos rojos (aproximadamente 5000 células). Se añadieron luego 10^{-4} moles de cisteína. La mediciones de las corrientes de reducción se muestran en la Tabla 4 a continuación.

30 **Tabla 4**

Nº	Composición	Corriente de reducción
1	PBS sola (control negativo)	0,05 mA
2	PBS + ADA + Glóbulos rojos (control positivo t = 0)	0,6 mA
3	PBS + ADA + Glóbulos rojos (t = 5 minutos)	0,32 mA
4	PBS + ADA + Glóbulos rojos (t = 5 minutos + cisteína)	0,05 mA

Como se puede ver, entre las muestras N° 2 y 3, la corriente de reducción disminuyó de 0,6 a 0,32 mA que ilustra la degradación natural de ADA en el torrente sanguíneo. La concentración de cisteína añadida en la muestra 4 permitió recuperar el valor de la corriente de reducción de 0,05 mA (valor del tampón fosfato (PBS) solo), mostrando claramente que todo la ADA se había degradado.

5 **3.3 Efecto de la concentración de la cisteína en la degradación de ADA en la sangre**

Se utilizó un tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4 para realizar las mediciones amperimétricas y una concentración de ADA $2 \cdot 10^{-5}$ molar. Se añadieron a continuación concentraciones crecientes de cisteína para obtener respectivamente una concentración final de $1 \cdot 10^{-5}$ molar, $2 \cdot 10^{-5}$ molar, y $3 \cdot 10^{-5}$ molar de cisteína. La mediciones de la corriente de reducción se muestran en la Tabla 5 a continuación.

10

Tabla 5

N°	Composición	Corriente de reducción después de 1 minuto
1	PBS sola (control negativo)	0,15 mA
2	PBS + ADA (control positivo)	0,6 mA
3	PBS + ADA + $1 \cdot 10^{-5}$ molar de Cys	0,4 mA
4	PBS + ADA + $2 \cdot 10^{-5}$ molar de Cys	0,25 mA
5	PBS + ADA + $3 \cdot 10^{-5}$ molar de Cys	0,17 mA

15 Como se puede ver en la Tabla 4, para la relación de 3 moléculas de cisteína por 2 moléculas de ADA, el paso de corriente en la solución es vuelto a llevar a su punto inicial en el minuto posterior a la adición de cisteína, lo que confirma el modelo teórico que sugiere que se necesitan dos moléculas de cisteína para obtener una reducción completa de una molécula de ADA.

Ejemplo 4.- Producción del virus VIH inactivado por ADA micronizada

20 **4.1 Producción de virus VIH en cultivo a pequeña escala:**

El virus se obtiene por cultivo de partículas virales recogidas durante una extracción de sangre según un protocolo estándar, tal como el descrito por Goebel et al., (AIDS 2001 vol.15 - pp. 33-45) bajo el título "Ex vivo HIV-1 cultures".

25 Se extrajeron virus del paciente que iba a tratar gracias a un co-cultivo de sus propios linfocitos T CD4+ infectados en presencia de monocitos periféricos (células PBMC) obtenidos de la muestra de sangre del paciente. A continuación los linfocitos CD4+ infectados se activaron por fitohemaglutinina (Sigma, St. Louis, Mo. USA).

30 Cada 7 días se tomó una muestra del líquido sobrenadante para medir la proporción de p24 y por lo tanto evaluar el crecimiento viral. Cuando la proporción de p24 era 50 pg/mL, el cultivo celular se centrifugó y el líquido sobrenadante se conservó en lotes madres de virus a -80°C de manera que se obtuvieran después de ultracentrifugación $2 \cdot 10^{10}$ partículas virales por mL.

4.2 Producción de virus VIH inactivado

35 La solución madre de partículas virales congelada a -80°C se trató durante 2 horas a 37°C, con una concentración 0,5 mM de azodicarbonamida (ADA) micronizada (HPH116 de la compañía H-Phar Bélgica) que, como se describió anteriormente, destruyó la proteína con dedo de zinc n° 7 de la nucleocápsida viral. La composición viral se trató de manera que la cantidad de virus desactivado por ADA implicaba la presencia de 200 ng/mL de p24 procedente del virus VIH ya sea específico para el paciente cuando se usa el virus VIH obtenido en el apartado 4.1 o ya sea el virus VIH cultivado cuando se utiliza el virus cultivado como en el apartado 4.2. La cantidad de p24 se determinó utilizando el «rHIV-1 p24 Coulter Assay (Beckman Coulter, FL)», e indicó la presencia de 200 ng/mL de p24.

La solución así obtenida se centrifugó a continuación a baja velocidad y el sedimento se desechó para eliminar el zinc expulsado y precipitado. El líquido sobrenadante que contenía el virus inactivado se conservó para las etapas posteriores.

4.3 Degradación de la ADA por cisteína.

- 5 La composición viral así obtenida que contenía una concentración de p24 de 200 ng/mL se trató luego con una concentración 0,5 mM de cisteína (N-acetil-L-cisteína de pureza $\geq 99\%$ (TLC), Sigma Aldrich USA). De esta manera, el posible remanente de ADA fue reducido a biurea por la cisteína, que es un donador de protones.

4.4 Medición de la inactividad de virus tratados con ADA micronizada

La inactividad de los virus se controlada por el método de la DICT₅₀ mencionado anteriormente.

- 10 Para la solución que contenía los virus inactivados y tratados con cisteína, se obtuvo una reducción del poder infeccioso de 5 logaritmos que ilustra una pérdida total del potencial infeccioso de la composición de virus inactivado según la invención.

Ejemplo 5.- Producción del virus de la hepatitis C inactivado por ADA micronizada

15 5.1 Producción de virus de la hepatitis C

Se utilizaron células hepáticas sanas procedentes de bancos de órganos que proporcionaron tejido hepático sano para un posible trasplante, pero no se pudieron utilizar por razones tecnológicas, aunque no médicas.

Los lóbulos hepáticos encapsulados así obtenidos se trataron por el método de Segnen modificado que permite prever un rendimiento suficiente para disponer de reservas adecuadas de hepatocitos.

- 20 Los fragmentos hepáticos (lóbulos de 150 g a 500 g) se dotaron de catéteres que permitieran la perfusión de tres a cinco vasos hepáticos.

25 El fragmento se perfundió luego durante 20 a 30 minutos a 37°C por una solución salina exenta de calcio, denominada solución de Hanks (solución salina equilibrada de Hank (HBSS) NaCl 137 mM, KCl 5,4 mM, MgCl₂ 0,5 mM, MgSO₄ 0,4 mM, Na₂HPO₄ 0,33 mM, K₂HPO₄ 0,44 mM, D-glucosa 5,5 mM) a la que se había añadido ácido etilenglicol-tetraacético (EGTA) 0,5 mM

Siempre a 37°C, la perfusión se reemplazó por el medio según Leibovitz L-15 (33) que contenía 0,05% de colagenasa, durante 30 minutos, provocando así la digestión de las uniones intercelulares.

- 30 Después de 30 minutos, los catéteres se cortaron y la biopsia se transfirió, siempre estérilmente, a un recipiente en donde se hizo una incisión en su cápsula. Se agitó con precaución en el medio L15 refrigerado (4°C) sobre hielo a fin de favorecer la dispersión de los hepatocitos.

35 La suspensión celular resultante se filtró luego a través de tamices de acero inoxidable estériles para deshacerse de los fragmentos hepáticos demasiado grandes, para obtener un tamaño de fragmentos de 100 μ M. La suspensión celular obtenida se filtró luego siempre estérilmente por una compresa de nylon para obtener células de un tamaño de 60 μ M. El residuo filtrado en suspensión se dividió en fracciones alícuotas en tubos de 250 mL y se centrifugó tres veces a 40 g durante 3 minutos a 4°C.

Después de la última centrifugación, las células procedentes de las fracciones alícuotas se volvieron a poner en suspensión en un medio HypoThermosol-FRS® [Solutions BioLife, Inc.] en un solo tubo y se colocó sobre hielo.

- 40 Las células en suspensión así obtenidas se centrifugaron de nuevo a 700 revoluciones/minuto (rpm) durante 5 minutos a 4°C, se retiró el líquido sobrenadante y las células se lavaron tres veces con solución de lavado denominada de Hanks "Hanks Wash" [(0,4 g/L de KCl 53,6 mM; 0,06 g/L de KH₂PO₄ 4,4 mM; 8 g/L de NaCl 1,37 M; 0,048 g/L de Na₂HPO₄ 3,4 mM; 20 mL de CaCl₂ (2 molar)].

Las células centrifugadas y lavadas se pusieron de nuevo en suspensión en un medio esencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) para el cultivo en pocillos de placas, de células hepáticas (500 mL de DMEM de alto contenido en glucosa (4,5 g/L complementado con 20% de suero bovino fetal).

- 45 En placas de 24 pocillos, los pocillos se llenaron a razón de 0,625 x 10⁶ hepatocitos/mL diluidos en aproximadamente 10 mL de colágeno tipo 1 (Colagen I, *rat tail-BD* N° de catálogo 354236) - (en forma de un líquido que contenía ácido acético 0,02 N, concentración 50 mg/mL) de tal manera que los pocillos y sus tapas estuvieran cubiertos.

Las placas así preparadas se mantuvieron durante 1 hora a temperatura ambiente (22°C).

En este momento, se retiró la solución de colágeno y los pocillos se lavaron con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4) y se complementó con el medio de cultivo en placas de hepatocitos (abreviadamente HPM por la expresión inglesa *Hepatocyte Plating Culture*) al que se había añadido 20% de suero de ternera fetal. (Adaptado a los hepatocitos de todas las especies).

Cuando los hepatocitos fueron confluentes (aproximadamente 18 horas) el HPM se sustituyó por un medio específico para los hepatocitos: 500 mL de medio esencial modificado por Dulbecco (DMEM) con alto contenido en glucosa (4,5 g/L); 30 mg de L-metionina; 104 mg de L-leucina; 33,72 mg de L-ornitina; 200 mL de dexametasona 5 mM; y 3 mg de insulina).

Se tomaron fracciones alícuotas en el centro de los pocillos de manera aleatoria después de 17 horas y se estimó el número de hepatocitos no adherentes midiendo la actividad de lactato-deshidrogenasa después de la lisis de las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS), como se describe anteriormente, que contenía 0,2% de Triton X-100. Se descartaron los pocillos en los que había menos del 85% de células adherentes. Del mismo modo, se descartaron los pocillos en los que había más de 5% de células en apoptosis, midiéndose la apoptosis por el método de valoración de la anexina V, el "*anexinn V assay*" que detectaba extremadamente pronto el proceso de involución celular porque aparecía la fosfatidilserina en la superficie celular. También se descartaron los cultivos que presentaban una tasa de alanina-aminotransferasa (ALT) superior a 3 veces la normal.

El medio de cultivo se cambió cada 72 horas.

Los hepatocitos así obtenidos fueron infectados por virus naturales de la hepatitis C. En este tipo de cultivo de hepatocitos se puede seguir la cascada replicativa de los virus VCH seleccionados desde el momento 0 hasta tres semanas después de la infección.

72 horas después de la infección la carga viral aumentó para estabilizarse en el intervalo entre 100.000 y 1.000.000 de partículas durante 3 semanas. Las partículas virales se recuperaron del medio de cultivo por ultracentrifugación y se congelaron a -80°C a una concentración, por ejemplo de $2 \cdot 10^{10}$ partículas virales por mL de medio de congelación (con alto contenido de DMEM).

5.2 Producción del virus inactivado

La solución madre de partículas virales congeladas a -80°C se trató durante 2 horas a 37°C por una concentración de de azodicarbonamida (ADA) micronizada 0,5 mM (HPH116 disponible en la compañía H-Phar Bélgica) que, como se ha descrito anteriormente, destruía la proteína con dedo de zinc NS5A que es indispensable para el ciclo replicativo del VCH.

La solución así obtenida se centrifugó luego a baja velocidad y el sedimento se desechó para eliminar el zinc expulsado y precipitado. El líquido sobrenadante que contenía el virus inactivado se conservó para las etapas posteriores.

5.3 Degradación de ADA por cisteína.

La composición viral así obtenida se trató luego con una concentración de 0,5 mM de cisteína (N-acetil-L-cisteína de pureza $\geq 99\%$ (TLC), Sigma Aldrich, USA). De esta manera, el posible remanente de ADA fue reducido a biurea por la cisteína.

5.4 Medición de la inactividad de virus de hepatitis C tratados con ADA micronizada

Se utilizó una línea celular Huh 7 (hepatoma) (ET) que contenía el material genético de la hepatitis C, el ARN asociado a un control estable de luciferasa (Luc) para medir el efecto de la inactivación de la azodicarbonamida micronizada (HPH-116 disponible en la compañía H-Phar Bélgica).

El control positivo fue un tratamiento con interferón alfa (PBL Biolabs, New Brunswick, NJ, USA). Las células ET se cultivaron en un medio esencia modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con 10% de suero de ternera fetal, 1% de penicilina/estreptomina, 1% de glutamina, 5 mg/mL de G418 en una incubadora a 37°C bajo una atmósfera que contenía 5% de CO_2 (todos los reactivos eran de Gibco Life Technologies, USA.). Las células fueron triptinizadas (1% de tripsina en EDTA) y distribuidas en placas que contenían 96 pocillos de investigaciones (Costar®). La actividad del gen informador de luciferasa (expresada en unidades Internacionales UI) estaba proporcionalmente asociada con la producción de ARN de virus de la hepatitis C. La concentración inhibidora para del 50% de la producción de ARN era en este modelo de 45 $\mu\text{g/mL}$ de ADA después de 72 horas del tratamiento.

Ejemplo 6.- Producción de virus del Ébola inactivado por ADA micronizada**6.1 Producción de virus del Ébola:**

5 Células Vero infectadas por el virus del Ébola se cultivaron en medio esencial modificado por Dubecco (DMEM) complementado con 10% de suero de ternera fetal, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de glutamina, 5 mg/mL de G418 en una incubadora a 37°C en una atmósfera que contenía 5% de CO₂ (todos los reactivos procedían de Gibco Life Technologies USA) durante 72 horas.

El virus se recogió del líquido sobrenadante del cultivo por ultracentrifugación y se congeló a -80°C a una concentración, por ejemplo de 2.10¹⁰ partículas virales por mL de medio de congelación.

6.2 Producción de virus inactivado

10 La solución madre de partículas virales congeladas a -80°C, se trató durante 2 horas a 37° C, con una concentración 0,5 mM de azodicarbonamida (ADA) micronizada (HPH116, H-Phar Gosselies, Bélgica) que destruyó la proteína con dedo de zinc denominada VP30. Se ha demostrado que VP30 es indispensable para la replicación del virus del Ébola e intolerante a cualquier mutación de éste.

15 La solución así obtenida se centrifugó a continuación a baja velocidad y el sedimento se desechó para eliminar el zinc expulsado y precipitado. El líquido sobrenadante que contenía el virus inactivado se conservó para las etapas posteriores.

6.3 Degradación de ADA por cisteína.

20 La composición viral así obtenida se trató a continuación con una concentración 0,5 mM de cisteína (N-acetil-L-cisteína, pureza \geq 99% (TLC), Sigma Aldrich, USA). De esta manera, el posible remanente de ADA fue reducido a biurea por la cisteína.

6.4 Medición de la inactividad de los virus del Ébola tratados por ADA micronizada

25 Se evaluó la actividad del virus inactivado según la invención por infección de células VERO naturales cultivadas según un protocolo estándar y por infección de células Vero que expresaban la proteína VP30 (transfección de células VERO por el gen que codifican la proteína VP30) como control positivo.

Como era de esperar las células VERO normales infectadas no produjeron nuevas partículas virales, mientras que las células VERO transfectadas por el gen de VP30 produjeron virus del Ébola completos.

30 Además, según la invención, se prevé igualmente valorar el zinc liberado para medir la inactivación del virus, puesto que cada inactivación de las proteínas con dedo de zinc expulsan un átomo de zinc al medio de tratamiento del virus con ADA micronizada.

Ejemplo 7.- Producción de arenavirus inactivado por ADA micronizada**7.1 Producción del arenavirus:**

35 Células Vero infectadas con tres diferentes arenavirus, virus LCMV-WE recibido de Peter B. Jahrling (*U.S. Army Medical Research Institute for Infectious*, Fort Detrick, Frederick, Md.) JUNV y TCRV, se cultivaron por separado en medio esencial modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con 10% de suero de ternera fetal, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de glutamina, 5 mg/mL de G418 en una incubadora a 37°C bajo una atmósfera que contenía 5% de CO₂ (todos los reactivos procedían de Gibco Life Technologies, USA.) durante 72 horas, hasta obtener 10⁷ virus/mL de medio de cultivo.

40 El virus se recogió del líquido sobrenadante de cultivo por ultracentrifugación y se congeló a -80°C a una concentración de por ejemplo 2.10¹⁰ partículas virales por mL de medio de congelación.

7.2 Producción de virus inactivado

45 La solución madre de partículas virales congeladas a -80°C, se trató durante 2 horas a 37°C, con una concentración 0,5 mM de azodicarbonamida (ADA) micronizada (HPH116, H-Phar Gosselies, Bélgica), que destruyó la proteína denominada PZ con un resto de dedo de zinc. La replicación de los arenavirus está condicionada por una proteína con restos de dedos de zinc denominada PZ. Las proteínas ribosomales de la célula hospedante interactúan con la proteína PZ y los ribosomas, estrechamente asociados al genoma viral intervienen en la traducción de los ARNm virales.

La solución así obtenida se centrifugó a continuación a baja velocidad y el sedimento se retiró para eliminar el zinc expulsado y precipitado. El líquido sobrenadante que contenía el virus inactivado se conservó para las etapas posteriores.

7.3 Degradación de ADA por cisteína.

- 5 La composición viral así obtenida se trató a continuación con una concentración 0,5 mM de cisteína (N-acetil-L-cisteína de pureza $\geq 99\%$ (TLC), Sigma Aldrich, USA). De esta manera, el posible remanente de ADA fue reducida a biurea por la cisteína.

7.4 Medición de la inactividad de arnavirus tratados con ADA micronizada

- 10 Se evaluó la actividad del virus inactivado según la invención por una medición de la absorción de UV. La proteína PZ del virus activo presentaba una estructura cíclica en la cual se encontraba el átomo de zinc. Esta proteína absorbía radiación UV en su estructura cíclica a una longitud de onda de 950 nm. La expulsión del átomo de zinc conducía a la desestabilización de la estructura cíclica de la proteína PZ viral y daba como resultado que la proteína PZ ya no absorbía radiación UV a la misma longitud de onda. La medición de la absorción de UV a una longitud de onda de 200 nm permitió medir la inactividad de la proteína PZ.
- 15 En este caso, los virus JUNV y TCRV tratados con ADA permitieron obtener respectivamente los valores de CI_{50} de 7,6 y 5,3 μM , mientras que el virus LCMV-WE tratado con ADA permitió alcanzar valores de CI_{50} de 27,9 μM respectivamente.

Ejemplo 8.- Vacuna para administración directa

8.1 Preparación de vacuna para administración directa por inyección

20 Vacuna a base de virus autólogo

Se tomaron 0,5 mL de virus tales como los obtenidos en el Ejemplo 4.1 ($2 \cdot 10^{10}$ partículas virales/mL) y estos virus se expusieron a una concentración de 3 μM de ADA micronizada (HPH116) durante 2 horas a 37°C.

- 25 A continuación se añadieron 0,5 mL de adyuvante incompleto de Freund para obtener un volumen final de 1 mL. Esta dosis de vacuna se preparó según los protocolos bien establecidos en este campo y por supuesto, si es necesario, también se pueden añadir excipientes de conservación. La dosis de 1 mL será inyectada luego en 4 dosis de 0,25 mL (cuatro inyecciones repartidas en el cuerpo, los hombros y las caderas).

Vacuna a base de una preparación viral regional

- 30 Se cultivaron cepas del VIH-1 naturales de los subtipos A, B y D sobre linfocitos de voluntarios sanos con el fin de obtener en el medio de cultivo RPMI como ya se ha descrito en detalle anteriormente. A continuación, los linfocitos infectados fueron activados por fitohemaglutinina.

Cada 7 días, se tomó una muestra de líquido sobrenadante para medir la proporción de p24 y por lo tanto evaluar el crecimiento viral. Cuando la proporción de p24 era 50 pg/mL, se centrifugó el cultivo celular y el líquido sobrenadante se conservó en lotes de virus de reserva a -80°C para obtener después de ultracentrifugación $2 \cdot 10^{10}$ partículas virales por mL.

- 35 Se tomaron 0,5 mL de los virus así obtenidos ($2 \cdot 10^{10}$ partículas virales/mL) y estos virus se expusieron a una concentración de 3 μM de ADA micronizada (HPH116) durante 2 horas a 37°C.

- 40 A continuación se añadieron 0,5 mL de adyuvante incompleto de Freund para obtener un volumen final de 1 mL. Esta dosis de vacuna se preparó según los protocolos bien establecidos en este campo y por supuesto, si es necesario, también se pueden añadir excipientes de conservación. La dosis de 1 mL será inyectada luego en 4 dosis de 0,25 mL (cuatro inyecciones repartidas en el cuerpo, los hombros y las caderas).

Esta preparación de vacuna tenía, por supuesto, un fin profiláctico o terapéutico. Preferiblemente, la inyección se repitió después de 4 semanas.

8.2 Preparación de vacuna para administración directa intramucosal o intralinfática

- 45 Se preparó una dosis $DICT_{50}$ de virus VPH inactivado de una manera análoga a la descrita anteriormente y se puso en suspensión en un óvulo para introducción en la vagina. La composición de los óvulos se muestra en la Tabla 6

Tabla 6.

Ingredientes	Cantidad
Virus inactivado según el ejemplo 4.2	10 ⁶ para 1 mL
Sal sódica del ácido hialurónico	5 mg
Extracto lipídico de <i>Centella asiatica</i>	60 mg
Extracto lipídico de <i>Calendula officinalis</i>	60 mg
Extracto lipídico de Aloe vera	60 mg
Aceite esencial de melaleuca	2 mg
Excipientes	-

5 Estos excipientes son glicéridos semisintéticos, BHT (butil-hidroxitolueno), isopropil-parabeno, isobutil-parabeno butil-parabeno y análogos. Estos excipientes presentan efectos galénicos particulares: después de licuación del óvulo a la temperatura corporal, los virus inactivados se distribuyen uniformemente en la vagina en cuestión de minutos. Allí se depositan formando una película de gel que se reabsorbe lentamente en 2-3 días. La sal sódica del ácido hialurónico presenta por su parte una función de sustrato en la migración celular.

Luego dichos virus son absorbidos por las células dendríticas de la paciente y las proporciones de anticuerpos en sangre que aparecen para el VPH confirman la vacunación.

Ejemplo 9. Preparación de una vacuna con ayuda de células dendríticas aisladas.

10

9.1. Cultivo de células dendríticas

Después de la extracción de sangre a un sujeto infectado con VIH y la transferencia a tubos tratados con citrato se aislaron monocitos circulantes por el método de centrifugación en gradiente de densidad según el método de Ficoll-Hypaque (Eurobio, les Ulis, Francia) (células mononucleares de sangre periférica (abreviadamente PBMC, por la expresión inglesa *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)).

15

Estos monocitos se lavaron a continuación 4 veces sucesivamente con una solución tampón de Hanks.

A continuación se realizó una inmunoselección negativa utilizando un kit comercial (Dynal, Great Neck, New York, USA) para aislar los monocitos que llevaban el receptor CD14⁺. El 90% de los monocitos aislados eran 90% de las células que llevaban el receptor CD14⁺ (células CD14⁺ puras en el 90%).

20 A continuación, se distribuyeron en matraces (Nunc, Roskilde, Dinamarca) a razón de 10⁶ células/mL en un medio libre de suero "*serum-free AIM-V medium*" (Life Technologies, Great Island, New York, USA.).

Estas células se cultivaron así durante 5 días en el medio AIM-V complementado con 250 ng del factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (R & D Systems, Minneapolis, USA) y 100 ng de interleuquina 4 (IL-4) (R & D Systems, Minneapolis, USA) por mililitro.

25 Después de este tratamiento y 5 días de cultivo, se identificaron las células no adherentes, siendo más del 90% células dendríticas (DC) inmaduras, en base a su morfología (observación microscópica) y a los receptores de membrana expresados (CD1a, CD11c, CD40, CD80, CD86, CD4 y HLA-DR como se pone de manifiesto por inmunofluorescencia directa en citometría de flujo).

9.2 Inducción de una respuesta específica al virus del paciente por las células dendríticas del paciente

30 Las células CD inmaduras así obtenidas (1.10⁶ células/mL) fueron sometidas a impulsos por el VIH autólogo inactivado por ADA obtenido en el Ejemplo 4 (apartado 4.2) (50 ng de p24) según una relación de 50 ng de p24/10⁶ células) durante 2 horas a temperatura ambiente.

Las células CD así impulsadas por el antígeno del VIH autólogo inactivado (CD-VIH-impulsados) se lavaron luego tres veces consecutivas con la solución tampón de Hanks.

35 Las CD-VIH-impulsadas se cultivaron (37°C - 5% de CO₂) en medio AIM-V complementado con 100 ng de GM-CSF, 5 ng de IL-4, 50 ng de TNF-α (R & D Systems USA) y 1000 unidades de interferón alfa 2b (IFN-α-2b) (Schering-Plough, Brinny, Irlanda) por mililitro durante tres días.

5 Las células dendríticas así cultivadas en presencia de virus inactivados según la invención internalizaron el virus inactivado y por tanto se denominan cargadas o estimuladas y listas para ser reinyectadas por la vía de administración subcutánea, intradérmica o intralinfática. Estas células dendríticas fueron activadas por la acción de citoquinas y expresaron en su superficie antígenos (péptidos) específicos del virus inactivado internalizado a los que se había permitido estimularlas.

Se entiende que la presente invención de ningún modo está limitada a las formas descritas anteriormente y que se pueden hacer muchas modificaciones sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

10 Por ejemplo, en lugar de utilizar virus autólogo, cultivado o no, para preparar una vacuna con virus inactivado, es también posible utilizar un cultivo del virus VIH a gran escala. En este caso, el virus se obtiene por una producción por células. Por ejemplo, el virus VIH se puede cultivar a gran escala como se describe en la patente EP0524961. El virus cultivado será igualmente recuperado por ultracentrifugación del líquido sobrenadante de cultivo y congelado a -80°C a una concentración, por ejemplo de $2 \cdot 10^{10}$ partículas virales por mL de medio de congelación.

REIVINDICACIONES

1. Composición para su utilización como vacuna a base de al menos una cepa de virus que presenta al menos una proteína PZ con uno o varios restos de dedo de zinc, que comprende estos virus en un estado inactivado, estando estos virus completos y presentando después de la inactivación una envoltura viral intacta,

caracterizada por que dicho zinc de dicha proteína PZ ha sido expulsado de dicha al menos una proteína PZ por una reacción de oxidorreducción con azodicarbonamida y por que dicha composición comprende además biurea formada a partir de azodicarbonamida durante dicha reacción de oxidorreducción, así como posiblemente un remanente de azodicarbonamida sin reaccionar.

2. Composición para su utilización según la reivindicación 1, caracterizada por que contiene además un donador de protones farmacéuticamente compatible, en particular un agente reductor fisiológico que está presente en un estado desprotonizado, que es igualmente farmacéuticamente compatible, y que resulta de una reacción de oxidorreducción adicional con dicho remanente de azodicarbonamida sin reaccionar, así como posiblemente un resto de donador de protones sin reaccionar.

3. Composición para su utilización según la reivindicación 2, caracterizada por que el donador de protones se elige del grupo que consiste en cisteína, glutatión, fosfato de nicotinamida (NADPH) y sus derivados y mezclas, y por que el donador de protones desprotonizado es respectivamente cistina, glutatión oxidado, NADP⁺ o uno de sus derivados.

4. Composición para su utilización según una u otra de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que dicha al menos una cepa del virus se elige del grupo de retrovirus, arenavirus, filovirus, hepavirus, papilomavirus y herpesvirus, que presentan proteínas PZ.

5. Composición para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que comprende además células inmunocompetentes aisladas que posiblemente tienen al menos internalizados dichos virus inactivados.

6. Procedimiento para la preparación de una composición de vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende:

- una puesta en contacto de al menos una cepa de virus, que presenta al menos una proteína PZ con uno o varios restos de dedos de zinc, con azodicarbonamida micronizada,
- una penetración de la azodicarbonamida micronizada a través de la envoltura viral de dichos virus, dejándola intacta,
- una inactivación de los virus por una reacción de oxidorreducción entre la azodicarbonamida micronizada y dicha al menos una proteína PZ, lo que da como resultado una expulsión del zinc de la proteína PZ, y una descomposición al menos parcial de la azodicarbonamida en biurea,
- una puesta en contacto de los virus inactivados con un donador de protones farmacéuticamente aceptable, en particular un reductor fisiológico, que es también farmacéuticamente aceptable en el estado desprotonizado, y
- una reacción de oxidorreducción adicional entre dicho donador de protones y un posible remanente de azodicarbonamida sin reaccionar, lo que desprotoniza dicho donador de protones y descompone dicho remanente en biurea.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado por que el donador de protones se elige del grupo que consiste en cisteína, glutatión, fosfato de nicotinamida y sus derivados y mezclas, y por que el donador de protones desprotonizado es respectivamente cistina, glutatión oxidado o NADP⁺ o uno de sus derivados.

8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, caracterizado por que la azodicarbonamida micronizada se presenta en forma de partículas que están desprovistas de aditivos y que tienen un tamaño inferior a 10 µm, preferiblemente a 8 µm, en particular a 5 µm.

9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizado por que comprende, además, un eliminación del zinc expulsado.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado por que comprende además un aislamiento de los virus inactivados.

11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, caracterizado por que comprende además una impulsión de células inmunocompetentes aisladas por dicha composición que contiene virus inactivados por azodicarbonamida, así como un cultivo *ex vivo* de las células impulsadas y una expresión en su superficie de antígenos específicos de dichos virus inactivados.

12. Utilización de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la fabricación de una vacuna profiláctica o terapéutica contra al menos una infección por al menos uno de dichos virus que presenta al menos una proteína PZ con uno o varios restos de dedos de zinc.

5 13. Utilización según la reivindicación 12, en la cual la vacuna producida es una vacuna administrable por inyección o por vía transmucosal, oral, genital o rectal.

