

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 696**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/125 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.10.2012 PCT/EP2012/070653**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13057191**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2012 E 12775490 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2768527**

54 Título: **Vacuna de múltiples CBV para prevenir o tratar la diabetes tipo 1**

30 Prioridad:

18.10.2011 EP 11306344

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

23.11.2017

73 Titular/es:

**VACTECH OY (100.0%)
Biokatu 8
33520 Tampere, FI**

72 Inventor/es:

**HYÖTY, HEIKKI;
KNIP, MIKAEL;
LAITINEN, OLLI;
TOLONEN, OUTI;
PULKKI, MINNA;
OIKARINEN, SAMI;
HONKANEN, HANNA-RIIKKA;
LECOUTURIER, VALÉRIE;
ALMOND, JEFFREY y
FLODSTRÖM-TULLBERG, MALIN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 643 696 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

Vacuna de múltiples CBV para prevenir o tratar la diabetes tipo 1

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones antivirales, p. ej. vacunas, y a métodos útiles para prevenir o tratar la diabetes tipo 1. Más particularmente, la invención se refiere a una vacuna que comprende enterovirus, componentes de los mismos y/o anticuerpos para los mismos.

Antecedentes de la invención

10 La diabetes tipo 1 (T1D) es una enfermedad grave que se ha hecho cada vez más frecuente a una edad muy temprana. En la diabetes tipo 1, las células β del páncreas se destruyen, lo que conduce a una deficiencia de insulina. Se cree que la destrucción de las células β está provocada por una respuesta autoinmunitaria, que a su vez se supone que es inducida por una infección viral.

15 La relación entre los enterovirus y la T1D se ha documentado en multitud de estudios. Se han detectado enterovirus en el páncreas, la sangre y la mucosa intestinal de pacientes con T1D más frecuentemente que en sujetos de control y estudios prospectivos han apoyado su papel en el inicio del proceso de daño a las células β asociado con la T1D. Los enterovirus infectan las células β pancreáticas en cultivo celular y provocan diabetes en modelos animales. Por lo tanto, se han sugerido vacunas para enterovirus para prevenir la T1D. Sin embargo, el conocimiento de qué serotipos de enterovirus están implicados en la enfermedad es limitado.

20 El grupo de enterovirus incluye más de 100 serotipos diferentes y, debido a que una vacuna que cubra los 100 serotipos de enterovirus no es realista usando las tecnologías de vacunas estándar actuales, el conocimiento de qué serotipos están implicados en la T1D es crítico para el desarrollo de vacunas. Las infecciones por enterovirus son habitualmente subclínicas, pero también pueden provocar diversos tipos de enfermedades. Por ejemplo los poliovirus, el virus de Coxsackie B (CBV), el virus de Coxsackie A (CAV) y el ecovirus así como numerosos enterovirus son enterovirus que se sabe que están implicados en el desarrollo de una variedad de enfermedades. Por ejemplo, Lee et al., 2007, Arch Virol, 152:963-970 analizaron aislados clínicos de pacientes con meningitis aséptica, y encontraron que CBV5 era la cepa más predominante. Además, se identificaron CBV1, CBV3 y el ecovirus 9.

25 El espectro de serotipos responsables varía mucho de enfermedad a enfermedad, e incluso en una enfermedad como T1D los serotipos exactos no se han identificado totalmente y fiablemente. En efecto, estudios previos que presentan la relación entre enterovirus y T1D no fueron capaces de discriminar entre el serotipo o se restringieron a informes de casos. Algunos estudios han sugerido que un serotipo de CBV particular puede ser importante (Yoon et al., 1979 New Eng J of Med, v300, p1173; Hindersson M, et al., 2005, J Clin Virol v.33 p158; Dotta F. et al., 2007, PNAS 104: 5115; documento US2010/0047273 (Rappuoli et al.)). Sin embargo, también se han presentado esporádicamente otros enterovirus distintos a CBV (Cabrera-Rode et al., 2003, Diabetologia; Williams et al., 2006, J Clin Micro v.44 p441).

35 Klemola et al., 2008, Immunology of Diabetes V: Ann. N.Y. Acad. Sci 1150:210-212 analizaron muestras de aguas residuales con respecto a enterovirus no poliomiélfíticos. Los serotipos más comúnmente detectados eran CBV1-5, Echo6, 7, 11, 25 y 30. Se probaron con respecto al tropismo hacia los islotes. Se encontró que todos los serotipos eran destructivos. No se encontró ninguna evidencia que sugiriera que solo ciertos serotipos de enterovirus deban ser considerados potencialmente diabetogénicos.

40 El documento WO01/00236 (Hyöty et al.) sugiere el uso de poliovirus oral en una vacuna contra T1D. Además, sugiere otra vacuna anti-diabética que comprende uno o más enterovirus no poliomiélfíticos inactivados seleccionados del grupo que consiste en los serotipos de CBV 1, 2, 3, 4, 5 y 6, los serotipos de ecovirus 3, 4, 6, 9, 11, 22 y 30, los serotipos de CAV 9 y 16. Sin embargo, no se dan datos en cuanto al papel de los serotipos individuales listados. Se creía que la respuesta inmunitaria obtenida por OPV, que es una vacuna viva atenuada, inducía una respuesta inmunitaria reactiva cruzadamente mediada por linfocitos T, mientras que se creía que la vacuna inactivada era específica de un serotipo.

45 A pesar de la gran cantidad de investigación, todavía existe una gran necesidad de desarrollar medios y métodos eficaces para prevenir y tratar la diabetes tipo 1. Las realizaciones de la presente invención cumplen estas necesidades.

50 Compendio de la invención

55 La presente invención se basa en el hallazgo de que todo el grupo de virus de Coxsackie B (CBV) puede inducir diabetes tipo 1 (T1D). Pruebas preliminares mostraron que CBV1 y CBV2 eran claros serotipos de riesgo, mientras que CBV3, CBV4, CBV5 y CBV6 parecían reducir el riesgo de la enfermedad. La invención reside en el hallazgo sorprendente de que una vacuna aún más eficaz contra T1D debe incluir no solo los CBV que muestran un alto riesgo para inducir la enfermedad, sino también los serotipos que parecen neutros o incluso protectores contra T1D.

Además, se encontró una reacción cruzada mediada por anticuerpos entre los diferentes tipos de CBV. Este hallazgo hace factible usar vacunas inductoras de anticuerpos, es decir vacunas que comprenden virus inactivados, o componentes de los mismos. Estas vacunas son más seguras que las vacunas vivas atenuadas, pero todavía muy eficaces. Alternativamente, la vacuna ya puede contener anticuerpos contra los CBV.

5 La presente invención se dirige a una vacuna que comprende:

i) virus de Coxsackie B CBV1 y CBV2 en forma inactivada o en la forma de una vacuna subunitaria, una partícula pseudovirica (VLP), un ácido nucleico de dicho virus o una combinación de los mismos, y

10 ii) al menos un virus de Coxsackie B seleccionado del grupo que consiste en CBV3, CBV4, CBV5 y CBV6 en forma inactivada o en la forma de una vacuna subunitaria, una partícula pseudovirica (VLP), un ácido nucleico de dicho virus o una combinación de los mismos para el uso en el tratamiento de la diabetes tipo 1,

en donde el ácido nucleico de i) e ii) es un fragmento de ARN o ADNc viral que codifica el virus entero o una proteína viral individual.

15 La presente invención también se dirige a una composición, p. ej. una vacuna, que comprende: i) anticuerpos contra virus de Coxsackie B CBV1 y CBV2, y ii) anticuerpos contra al menos un virus de Coxsackie B seleccionado del grupo que consiste en CBV3, CBV4, CBV5 y CBV6.

La presente invención se dirige además a dichas vacunas para el uso en la prevención o el tratamiento de la diabetes tipo 1.

Además, la invención se dirige a una composición contra el virus de Coxsackie B para el uso en el tratamiento o la prevención de la diabetes tipo 1.

20 Se describe un método para prevenir o tratar la diabetes tipo 1 en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una vacuna que comprende: i) virus de Coxsackie B CBV1 y CBV2 en forma inactivada o en la forma de un componente de dicho virus, y ii) al menos un virus de Coxsackie B seleccionado del grupo que consiste en CBV3, CBV4, CBV5 y CBV6 en forma inactivada o en la forma de un componente de dicho virus.

25 También se describe un método para prevenir o tratar la diabetes tipo 1 en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una vacuna que comprende: i) anticuerpos contra virus de Coxsackie B CBV1 y CBV2, e ii) anticuerpos contra al menos un virus de Coxsackie B seleccionado del grupo que consiste en CBV3, CBV4, CBV5 y CBV6.

Además, se describe un método para prevenir o tratar la diabetes tipo 1 en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una composición contra virus de Coxsackie B (anti-CBV).

30 Algunas realizaciones específicas de la invención se indican en las reivindicaciones dependientes.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los valores de OR y CI, y la prevalencia de anticuerpos para los serotipos de CBV.

La Figura 2 muestra un compendio de los análisis de intervalos de tiempo de CBV1 con criterios rigurosos y relajados.

35 La Figura 3 muestra el alto riesgo de autoinmunidad de células β en niños de 1,5 años, que experimentaban infección por CBV1 en ausencia de anticuerpos maternos.

La Figura 4 muestra un riesgo atribuible a una población (PAR) combinado para CBV1 y CBV2.

La Figura 5 muestra viremia en ratones vacunados y no vacunados el Día 2 y el Día 7 después de la estimulación con CBV1 vivo con una dosis de 10^4 CCID₅₀ administrada a través de la vía ip.

40 La Figura 6 muestra la cuantificación de virus en el páncreas en ratones vacunados y no vacunados el Día 7 después de la estimulación con CBV1 vivo con una dosis de 10^4 CCID₅₀ administrada a través de la vía ip.

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención se basa en el nuevo hallazgo de que los seis virus diferentes del grupo de Coxsackie B (CBV) pueden ser virus de riesgo potenciales para la diabetes tipo 1 (T1D) y por lo tanto todos los CBV se pueden incluir en una vacuna. Este tipo de vacuna es óptimo para la prevención de T1D. Cada serotipo de CBV incluido en la vacuna también proporcionará protección no solo contra el tipo de virus homotípico sino también protección cruzada contra los otros tipos de CBV.

Existen seis serotipos de CBV genéticamente y estructuralmente muy relacionados que son los únicos enterovirus conocidos por usar el receptor celular CAR para entrar en la célula diana. CAR se expresa en células β productoras

de insulina humana en el páncreas y todos los CBV infectan productivamente células β *in vitro*. Los seis CBV pueden inducir protección cruzada interserotípica. Puesto que los seis serotipos son los únicos enterovirus que usan CAR, pueden compartir algunas características específicas, bien en cuanto a la antigenicidad o bien en cuanto al tropismo.

5 Existen virus de riesgo reconocidos tales como CBV1 y CBV2 que se asociaron con un incremento del riesgo de T1D en un estudio de cribado de anticuerpos para virus (virus causales). Además, ciertos otros serotipos de CBV tales como CBV3 y CBV6 se asociaron con una disminución del riesgo de T1D (efecto protector) en estos análisis. En análisis adicionales, la presencia de virus del grupo de CBV en suero se asoció con un incremento del riesgo de T1D, sugiriendo que todos los virus CBV pueden tener potencial diabetogénico. El potencial diabetogénico se puede
10 determinar en primer lugar por la capacidad para infectar células β . A continuación, se puede relacionar con cualesquiera serotipos de CBV y la patogenicidad puede estar modulada por mutaciones genéticas en cepas de CBV y recombinaciones que se sabe que se producen entre serotipos de CBV que circulan en una población dada. Esta modulación de la patogenicidad específica del serotipo y la cepa se ha observado para poliovirus. Los tres serotipos pueden provocar poliomielitis debido a que son los únicos enterovirus que usan PVR como su receptor, sin embargo, PV2 era generalmente menos patógeno que PV1 y, por otra parte, para cada uno de los serotipos, algunas cepas (p. ej. las cepas vacunales Sabin) mostraban una patogenicidad muy débil.

En una población, pocos serotipos de CBV pueden predominar como virus diabetogénicos tales como CBV1 y CBV2 en la población de Finnish en el presente estudio, mientras que otros serotipos de CBV pueden tener un efecto diabetogénico mucho más débil. Los virus con un potencial diabetogénico más débil parecerían entonces protectores debido a su capacidad para inducir protección cruzada inmunológica contra serotipos de CBV más diabetogénicos.
20

Un virus también puede ser diabetogénico en una parte de una población pero bien protector o bien neutro en otra parte de la misma población. Este fenómeno se puede basar, por ejemplo, en la diferente constitución genética de diferentes subpoblaciones tales como diferencias en HLA, MDA-5 u otros genotipos inmunológicamente importantes. Una de las características divisoras más claras de una población genética es el sexo, y por lo tanto se pueden
25 observar diferentes caracteres de riesgo, neutros o protectores para un serotipo cuando su influencia se estudia separadamente en hembras y machos. El carácter protector y de riesgo también puede depender del momento de la infección. Cuanto más tarde sea el intervalo de tiempo, más carácter de riesgo muestra el virus. Por otra parte, las infecciones a una edad muy temprana, sin protección proporcionada por anticuerpos maternos, pueden ser extremadamente arriesgadas.

30 Existen ciertas situaciones por las que los tipos de virus neutros o incluso protectores se pueden convertir en virus de riesgo o ciertos virus de riesgo se pueden reemplazar por otros:

Un ejemplo de este procedimiento es proporcionado por los poliovirus (pertenecientes a los enterovirus). En este caso, las cepas de vacuna atenuada viva inducen una respuesta inmunológica contra su predecesor silvestre. En algunos casos raros, las cepas de vacuna atenuada pueden volver a la forma causante de enfermedad y por lo tanto
35 representa un riesgo leve para la enfermedad. Esta cepa se puede denominar por lo tanto "poliovirus derivado de vacuna" (VDPV). La recombinación interserotípica es un mecanismo que puede conducir al surgimiento de nuevos virus de riesgo. Esto se puede producir entre serotipos genéticamente relacionados y en un fenómeno relativamente común, especialmente entre enterovirus muy relacionados (Vopr Virusol. mayo-junio 2005; 50(3):46-52). Un carácter especial de los CBV es que todos usan el receptor CAR e infectan células β pancreáticas *in vitro*. Las propiedades serológicas y las características de unión al receptor de los CBV se determinan por sus proteínas estructurales de la cápside, siendo las características de unión al receptor cruciales para el tropismo celular. Sin embargo, la dinámica o la virulencia de la infección está determinada principalmente por otras regiones del genoma de CBV; para las últimas, la importancia especial son las regiones no codificantes (NCR) 5' y 3' así como regiones codificantes de proteínas no estructurales. Las recombinaciones entre enterovirus se producen habitualmente entre los llamados
40 puntos calientes, que están en el genoma del enterovirus entre la NCR 5' y proteínas estructurales y entre proteínas estructurales y una proteína no estructural. Por lo tanto, la recombinación interserotípica puede conducir a la mezcla de las propiedades serológicas y de unión al receptor de una cepa con propiedades "patológicas" de otra cepa de enterovirus. Así, una vacuna para múltiples CBV tendrá un papel crucial para prevenir este tipo de desarrollo entre enterovirus asociados con T1 D. "Vacuna para múltiples CBV" se refiere a una vacuna dirigida a más de un serotipo de CBV.
45
50

En estudios de HPV, se ha encontrado que cuando las cepas de riesgo más fuertes se eliminan de las poblaciones humanas mediante vacunación, el nicho liberado puede ser ocupado por otras cepas causantes de enfermedad (Int J Cancer. 2011 Mar 1; 128(5):1114-9. doi: 10,1002/ijc.25675. Epub 2010 Nov 28.). Se puede producir un fenómeno similar si los serotipos de riesgo de CBV más fuertes se eliminan mediante vacunación. En estas poblaciones en las
55 que los serotipos de riesgo fuertes son raros, esto se puede producir naturalmente.

En vista de lo anterior, es razonable incluir muchos o la totalidad de los seis serotipos de CBV en la misma vacuna a fin de garantizar su eficacia máxima en cuanto a la protección inmunitaria contra enterovirus diabetogénicos.

La vacuna de la invención comprende los CBV en forma inactivada y/o comprende vacunas subunitarias, partículas pseudoviricas y ácidos nucleicos de los virus, en donde el ácido nucleico es un fragmento de ARN o ADNc viral que

codifica todo el virus o proteínas virales individuales y/o anticuerpos contra dichos virus. Además del CBV1 y CBV2 inactivado, vacunas subunitarias, partículas pseudovíricas y ácidos nucleicos de los virus, en donde el ácido nucleico es un fragmento de ARN o ADNc viral que codifica todo el virus o proteínas virales individuales del mismo, la vacuna contiene al menos uno, dos, tres o cuatro de CBV3, CBV4, CBV5 y CBV6, vacunas subunitarias, partículas pseudovíricas y ácidos nucleicos de los virus, en donde el ácido nucleico es un fragmento de ARN o ADNc viral que codifica todo el virus o proteínas virales individuales del mismo, o sus anticuerpos en cualquier combinación. Debido a la reactividad cruzada mediada por anticuerpos encontrada entre los CBV, también se puede obtener un efecto protector frente a un serotipo ausente. Sin embargo, en una realización preferida, la vacuna es una vacuna "pan-CBV", lo que significa que se dirige contra los seis serotipos, es decir, comprende CBV1, CBV2, CBV3, CBV4, CBV5 y CBV6 inactivados, y/o vacunas subunitarias, partículas pseudovíricas y ácidos nucleicos de los virus, en donde el ácido nucleico es un fragmento de ARN o ADNc viral que codifica todo el virus o proteínas virales individuales de dichos seis CBV, o anticuerpos contra dichos seis CBV. Se cree que la reactividad cruzada mediada por anticuerpos encontrada entre los CBV induce un efecto sinérgico en esta vacuna pan-CBV.

Las formas de los CBV presentes en la vacuna son independientes entre sí. Por ejemplo, algunos de los CBV pueden estar presentes en forma inactivada y otros como componentes, p. ej. como partículas pseudovíricas (VLP) o como subunidades. Convenientemente, todos los CBV presentes en la vacuna están en la misma forma, p. ej. inactivada, subunidades, VLP, ácidos nucleicos o anticuerpos.

Se considera que una "vacuna" es una composición capaz de proporcionar una respuesta inmunitaria protectora en el receptor. La vacuna bien puede provocar una respuesta inmunitaria activa, es decir, induce una respuesta inmunitaria protectora en el receptor, o bien puede proporcionar una respuesta inmunitaria pasiva, es decir ya contiene anticuerpos necesarios para prevenir o tratar la enfermedad.

La vacuna se administra en una "cantidad farmacéuticamente eficaz", que significa una cantidad que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria que protege al receptor de la vacuna contra el enterovirus bien al provocar anticuerpos neutralizadores o bien una respuesta mediada celularmente, o ambos. En el caso de los anticuerpos, una cantidad farmacéutica eficaz es una que media en una respuesta inmunitaria protectora contra el virus.

La vacuna puede contener el virus en forma "inactivada", lo que significa que se ha destruido la infectividad del virus. Según se usa en la presente memoria, el término también incluye virus que son de replicación deficiente. Un virus de replicación deficiente es un virus deficiente para una proteína constitutiva. Este virus puede entrar en la célula, aportar el genoma parcial, traducir las proteínas codificadas y replicar el genoma pero no puede encapsidar nuevas partículas. Así, no se puede extender a células o tejido próximos.

En caso de que la vacuna comprenda un componente del virus, el "componente" puede ser una estructura inmunogénica del virus tal como una subunidad del mismo incluyendo una subunidad quimérica, o un fragmento de ácido nucleico tal como parte del genoma del virus. El componente se puede producir o modificar recombinantemente o sintéticamente.

Así, la vacuna puede incluir virus enteros, cuya infectividad se ha inactivado, o vacunas subunitarias que contienen ciertas estructuras antigénicas, proteínas o péptidos del virus, o su combinación (tales como partículas pseudovíricas), o fragmentos de ARN o ADNc viral que codifica todo el virus o proteínas virales individuales o formas inactivadas del virus.

Se pueden producir vacunas inactivadas al propagar el virus en cultivos celulares y al purificarlo de células infectadas y medios de cultivo mediante centrifugación a alta velocidad en un gradiente de densidad formado por sacarosa u otros medios de alta densidad. Alternativamente, el virus se puede modificar mediante cromatografía. La infectividad de los virus purificados se destruye al inactivar los virus mediante tratamiento químico (p. ej. inactivación con formalina como la que se usa para producir vacuna antipoliomielítica inactivada), irradiación o tratamiento térmico. Se pueden preparar virus con replicación deficiente mediante inactivación física o genética, p. ej. al eliminar un gen estructural en el genoma viral, y producir una línea celular complementaria que expresa constitutivamente la proteína codificada por el gen eliminado a fin de replicar el virus deficiente.

Las vacunas subunitarias pueden consistir en proteínas virales purificadas o proteínas virales recombinantes, péptidos sintéticos correspondientes a epitopos antigénicos virales, partículas pseudovíricas o cápsides virales vacías, que se producen durante la infección pero carecen del genoma viral. Estas vacunas subunitarias se pueden administrar bien como tales o bien conjugadas a haptenos o vehículos (p. ej. partículas de ISCOM, quitosano, agonistas de TLR, micropartículas biodegradables).

En caso de que la vacuna comprenda un anticuerpo contra al menos uno de dichos enterovirus, el anticuerpo se puede producir contra todo el virus o contra un componente inmunogénico del mismo, o se puede producir recombinantemente. El término anticuerpo, según se usa en la presente memoria, incluye una molécula de anticuerpo entera de cualquier isotipo o fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos Fab y fragmentos scFv.

Las vacunas mencionadas anteriormente se pueden aportar parenteralmente mediante inyecciones (p. ej. intramuscularmente o subcutáneamente), oralmente, intradérmicamente, transcutáneamente, sublingualmente, intranasalmente, como inhalación, o rectalmente. Cada dosis inmunizadora incluye estructuras virales en un título

que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria apropiada en seres humanos. Esta dosis correspondería a la usada en una vacuna antipoliomielítica inactivada de tipo Salk que incluyera 1,8 - 2 µg de proteína viral por cada dosis y 20 - 40 unidades D antigénicas de poliovirus tipo 1, 4 - 8 unidades D antigénicas del poliovirus tipo 2 y 16 - 32 unidades D antigénicas del poliovirus tipo 3. La dosis también puede ser otra, si se ha confirmado que es segura e inmunogénica o capaz de estimular el sistema inmunitario.

Los enterovirus, sus componentes o anticuerpos se pueden aportar en diferentes combinaciones incluyendo uno o más serotipos de enterovirus aportados simultáneamente o en serie. Si los diferentes enterovirus, sus componentes o anticuerpos se aportan simultáneamente, la composición farmacéutica está en la forma de una mezcla de diferentes enterovirus, sus componentes o anticuerpos.

Los enterovirus, sus componentes o anticuerpos se usan en la fabricación de una vacuna contra la T1D. Se formulan en una composición farmacéutica que, además de los ingredientes activos que provocan la estimulación inmunitaria, puede comprender excipientes, vehículos, haptenos y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes, vehículos, haptenos y adyuvantes pueden incluir, por ejemplo, fenoxietanol, cloruro magnésico, sacarosa, tiomersal, formaldehído, fenol, antibióticos (conservantes) o sales de aluminio, micropartículas poliméricas, partículas de ISCOM, proteínas portadoras (p. ej. toxina del cólera), liposomas, micelas proteínicas (haptenos/adyuvantes) o agonistas de TLR.

La composición farmacéutica se administra preferiblemente a un niño de menos de 5 años, y más preferiblemente menos de 3 años, especialmente menos de 2 años y lo más preferiblemente menos de 1 año, con dosis de recuerdo aportadas más tarde en la vida para prevenir o tratar la T1D. Por ejemplo, se puede aportar a la edad de 3, 6 o 12 meses, con dosis de recuerdo a una edad superior. También se puede aportar a madres embarazadas para prevenir la T1D en el recién nacido, o prenatalmente a la madre embarazada y posnatalmente al recién nacido. Cuando se aporta a madres embarazadas, la respuesta de anticuerpos inducida protege al niño debido a que anticuerpos maternos de la clase IgG se transfieren al feto a través de la placenta y protegen así al niño hasta los 6 - 12 meses de edad cuando los anticuerpos maternos desaparecen de la circulación del niño. Además, estos anticuerpos protectores se transfieren mediante la leche materna al lactante. Se ha observado que estos anticuerpos maternos, especialmente anticuerpos de leche materna, protegen contra infecciones por enterovirus en lactantes (Sadeharju K, Knip M, Virtanen SM, Savilahti E, Tauriainen S, Koskela P, Akerblom HK, Hyöty H; Finnish TRIGR Study Group. Maternal antibodies in breast milk protect the child from enterovirus infections. *Pediatrics*. Mayo de 2007;119(5):941-6). El régimen de vacunación se puede usar en toda la población o en subpoblaciones que tienen un mayor riesgo de T1D. Estos grupos de alto riesgo pueden incluir madres o niños con patosensibilidad a T1D conferida por HLA, especialmente portadores de los alelos DR3 y/o DR4 de HLA, sujetos con diabetes tipo 1 con parentesco en primer o segundo grado o niños que dan positivo en la prueba de dos o más autoanticuerpos asociados con la diabetes.

Las vacunas descritas se pueden usar para prevenir y tratar la diabetes tipo 1, al inducir una respuesta inmunitaria contra CBV, y al eliminar el efecto diabetogénico de CBV en un sujeto que lo necesite al vacunar al sujeto con las composiciones farmacéuticas descritas. Los virus se administran convenientemente en forma inactivada, como subunidades, como partículas pseudovíricas (VLP) o como ácidos nucleicos. La prevención y el tratamiento también abarcan el uso de la vacuna para prevenir el avance de prediabetes en diabetes, es decir prevenir la infección, o la erradicación de una infección en curso en niños positivos a autoanticuerpos.

Si no se indica otra cosa, "diabetes tipo 1" o "T1D", según se indica en la presente memoria, se refiere a la forma clásica de la enfermedad, que está asociada a la aparición de autoanticuerpos contra células β pancreáticas. Esta enfermedad también se puede denominar "diabetes tipo 1 clásica" para distinguirla de la "diabetes tipo 1 fulminante", que es una forma de diabetes que está asociada a un proceso inflamatorio dominado por macrófagos, que no implica anticuerpos autoinmunitarios.

La diabetes tipo 1 se puede prevenir o tratar mediante un tratamiento antiviral. Este tratamiento puede ser, a modo de ejemplo, una interferencia de ARN basada en un método de ARNsi, un producto farmacéutico que previene el crecimiento de los CBV, un anticuerpo contra los CBV o su componente, o una molécula que previene la adhesión del virus a la célula, tal como un receptor celular soluble, o puede ser una vacuna contra los CBV. Estos tratamientos pueden prevenir el desarrollo de una enfermedad T1D o tratar una enfermedad que ya se ha desarrollado. A una persona que necesite el tratamiento o la prevención se le suministra una composición "contra el virus de Coxsackie B", que es una composición que contiene una cantidad eficaz de una sustancia contra CBV farmacéuticamente activa y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La sustancia contra CBV puede ser un medicamento antiviral, tal como un fármaco químico, una citocina tal como interferón-α o interferón-β, ARNsi o un péptido que previene la interacción entre el virus y el receptor, o una molécula receptora soluble, o anticuerpos anti-CBV.

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Análisis de seroneutralización

5 Se analizaron anticuerpos neutralizadores contra un amplio grupo de diferentes serotipos de enterovirus en la misma muestra de suero que era la primera muestra positiva a autoanticuerpos tomada durante el seguimiento prospectivo. Así, este momento representa el inicio del proceso de daño a células β. Además, anticuerpos contra esos serotipos que se encontraba que eran interesantes en este cribado inicial se midieron en momentos adicionales para estudiar la cronología de las infecciones y su relación con el inicio del daño a células β.

10 En conjunto, se han realizado análisis de seroneutralización usando 42 virus y 522 muestras de suero/plasma (174 tripletes, dos niños de control para cada niño "caso"). La finalización de los análisis en este grupo de virus varía de 100% a 84% (Echo30) siendo para una mayoría de los virus (35/40) más de 97,7%. A fin de estudiar el efecto de la variación de la cepa, se han analizado dos serotipos (CBV4 y Echo3) usando tanto las cepas silvestres recientemente aisladas (wt) como las correspondientes cepas de referencia (ATCC) (rs).

15 Los virus se analizaron en análisis de seroneutralización usando muestras de datos de seroconversión de autoanticuerpos. Los virus eran CAV4, CAV5, CAV10, CAV16, EV71, CAV9, CBV1, CBV2, CBV3, CBV4-wt, CBV4-rs, CBV5, CBV6, Echo1, Echo2, Echo3-wt, Echo3-rs, Echo4, Echo5, Echo6, Echo7, Echo9, Echo11, Echo12, Echo13, Echo14, Echo15, Echo17, Echo18, Echo19, Echo20, Echo21, Echo25, Echo26, Echo27, Echo29, Echo30, Echo32, Echo33, EV74, EV78 y EV94.

20 Los análisis de seroneutralización se llevaron a cabo principalmente usando un ensayo de neutralización de placas. en este análisis. En este análisis, se ha determinado la capacidad del suero/plasma para inhibir una cierta capacidad de virus para formar placas en capas celulares en comparación con controles, en los que se ha usado suero de ternero fetal en lugar de suero humano. En el análisis, se ha considerado que la inhibición es significativa (resultado positivo, ++) cuando ha sido más de 85%. El intervalo de inhibición entre 85-75% se ha considerado como positivo más débil (+) y la inhibición de menos de 75% se ha juzgado como un resultado negativo. Debido a que estos
25 análisis se han realizado usando dos diluciones de suero/plasma diferentes (1/4 y 1/16), los resultados se han combinado usando la clasificación mostrada posteriormente. Una minoría de los análisis (serotipos tales que no formaban placas) se ha llevado a cabo usando análisis de microneutralización, en el que la capacidad de los virus para destruir células se pueden comprobar mediante CPE y a través de tinción vital con violeta cristal. Se usó una
30 clasificación similar para los resultados del ensayo de microneutralización que para el ensayo de inhibición de placas.

Clase	1:4	1:16
Positivo máx (0)	++	++
Muy positivo (1)	++	+
Moderadamente positivo (2)	++	-
Positivo (3)	+	-
Negativo (4)	-	-

Resultados de la seroneutralización

35 Los datos brutos se exportaron al paquete Stata y se analizaron usando modelos de regresión logística condicionales para evaluar el riesgo de que ciertos serotipos provocaran T1D. Los resultados del análisis de regresión logística condicional se dan como razones de momios (OR). Si la OR en ciertos análisis es mayor de 1 y el límite inferior de intervalo de confianza (CI al nivel de 95%) permanece por encima de 1, se puede considerar que el virus confiere riesgo de T1D. Por otra parte, si tanto la OR como el límite superior del CI al 95% están por debajo de 1, este serotipo parece protector contra T1D. En estos casos, cuando OR está bien por encima o bien por debajo de 1 y además el CI al 95% incluye valores a ambos lados de 1, el resultado no es estadísticamente significativo
40 (P>0,05). En la Tabla 1, se presentan los valores de OR y CI para CBV1, CBV3 y CBV6.

Tabla 1. Los valores de OR y CI de CBV1, CBV3 y CBV6. Los resultados estadísticamente significativos están en negrita.

Virus	[OR (CI)]	[OR (CI)]	[OR (CI)]	
	0-3 frente a 4	0-1 frente a 2-4	0-2 frente a 4	0-1 frente a 4
CBV1	1,50 (1,02-2,23)	1,10 (0,65-1,87)	1,56 (0,94-2,58)	1,39 (0,68-2,85)
CBV3	0,39 (0,18-0,82)	0,56 (0,24-1,34)	0,36 (0,15-0,85)	0,50 (0,21-1,20)
CBV6	0,64 (0,41-0,97)	0,57 (0,21-1,59)	0,86 (0,50-1,51)	0,49 (0,16-1,57)

5 También se calculó la prevalencia de los anticuerpos (porcentaje de niños que tienen anticuerpos neutralizadores contra cada serotipo de virus). La Figura 1 muestra los resultados del subgrupo de CBV. Los datos representan el conjunto completo. Clases 0-3 frente a 4, las OR se muestran en el panel superior y la seroprevalencia en el panel inferior. Los resultados estadísticamente significativos se marcan con círculos.

10 Se encontró que CBV1 es un claro serotipo de riesgo para T1D, mientras que CBV3 y CBV6 parecen protectores. Esta asociación se extrajo en primer lugar de los resultados de la seroneutralización de un solo momento transversal que representa la primera muestra positiva a autoanticuerpos, y más tarde se confirmó en análisis de múltiples momentos en los que la cronología de las infecciones se analizó con más detalle. En estos análisis de múltiples puntos temporales, el resultado más claro era la fuerte asociación del efecto del riesgo de CBV1 con el intervalo de tiempo de seis meses inmediatamente precedente a la primera detección de autoanticuerpos relacionados con la diabetes tipo 1.

15 Análisis de seroneutralización de múltiples momentos con CBV1

Para estudiar la temporalidad de la infección por CBV1 con respecto a la aparición de AAB, los siguientes momentos se seleccionan para los análisis de seroneutralización:

- 12 meses antes de la seroconversión de autoanticuerpos
- 6 meses antes de la seroconversión de autoanticuerpos
- 20 • punto (primera detección de autoanticuerpos; estas muestras se analizaron previamente)
- 12 meses después de la seroconversión de autoanticuerpos
- Momento del diagnóstico de la diabetes tipo 1

Según este plan, aproximadamente 1.250 nuevas muestras que cumplieran los criterios anteriores se identificaron, se recogieron, se anonimizaron y se probaron.

25 Todas las muestras se cribaron usando diluciones en suero 1/4 y 1/16. En este informe, se ha utilizado generalmente la comparación de clases 03- frente a 4 y los análisis de sensibilidad 1 y 2, excepto en los análisis de criterios rigurosos (explicados posteriormente) en los que las infecciones se diagnosticaron mediante juicios subjetivos realizados por dos investigadores independientes sobre la base de criterios prefijados listados posteriormente para una infección aguda:

30 La infección aguda se diagnosticó según los siguientes criterios, que tenían que ser ciertos para una infección clasificada:

- Una seroconversión desde un título 0 hasta un título 4 o superior
- El título es 16 en al menos una de las siguientes muestras
- Todas las muestras de seguimiento siguen siendo positivas

35 Todos los análisis se realizaron enmascaradamente sin conocer el estado de caso-control del niño.

40 Se detectaron anticuerpos para células de los islotes mediante inmunofluorescencia indirecta, y se determinaron anticuerpos para insulina, ácido glutámico descarboxilasa y proteína similar a proteína tirosina fosfatasa (IA-2) con ensayos de radiounión específicos a partir de una muestra de suero usando métodos estándar. Si se detectaban dos de estos cuatro autoanticuerpos, el sujeto se consideraba positivo a autoanticuerpos (Näntö-Salonen et al., 2008. Lancet 372:1746-1755).

Análisis estadísticos de múltiples puntos temporales

5 Todos los análisis estadísticos presentados se basan en análisis de regresión logística condicional. Se llevaron a cabo tres tipos de análisis para este grupo de datos. La cronología de las infecciones se determinó y se analizó la relación de tiempo entre infecciones y la aparición de autoanticuerpos. En otras palabras, la frecuencia de las infecciones entre niños "caso" se compararon con los de niños de control en cada intervalo de tiempo separadamente. Los nuevos resultados de los momentos se analizaron de forma similar a la descrita anteriormente al comparar casos y controles en cada momento separadamente. Estos análisis se llevaron a cabo en todo el grupo en diferentes subgrupos según la siguiente lista:

- Grupo de datos totales procedente de toda la cohorte
- 10 • Género
- Edad
- Genotipo de HLA
- Zona de permanencia
- Combinaciones de diferentes AAB en ciertas muestras de seguimiento
- 15 • Diagnóstico de diabetes

Se han llevado a cabo análisis de seroneutralización de estos tres virus usando un ensayo de neutralización de placas como el descrito anteriormente.

20 Se realizaron análisis estadísticos en enfoques de criterios relajados y medios según las clases combinadas 0-3 frente a 4 y también se utilizaron análisis de sensibilidad, en los que la clase 3 (análisis de sensibilidad 1) o las clases tanto 2 como 3 (análisis de sensibilidad 2) se retiran del grupo de datos. En el enfoque de criterios rigurosos, los análisis de sensibilidad no se realizaron debido a su carácter de "sensibilidad" intrínseco.

Cronología de las infecciones

25 La cronología de las infecciones provocadas por CBV1 y los otros cinco serotipos relacionados se enfocó del siguiente modo: En primer lugar, las infecciones reconocidas se clasificaron en diferentes intervalos de tiempo con relación a la fecha de seroconversión a positividad a autoanticuerpos (fecha de AAB+). Los intervalos usados eran como sigue:

0. Sin infecciones o infección después de la fecha de AAB+
1. Infección más de 12 meses antes de la fecha de AAB+
2. Infección entre 12 y 6 meses antes de la fecha de AAB+
- 30 3. Infección dentro de 6 meses antes de la fecha de AAB+

35 En el enfoque de criterios relajados, el primer resultado positivo se aceptó como una infección independientemente de la posibilidad de anticuerpos maternos o la posibilidad de que los resultados de las muestras del último momento se vuelvan negativos. El enfoque de criterios medios se realizó de forma similar, excepto que los resultados que se desviaban por los anticuerpos maternos identificados se anularon. Este juicio fue realizado por dos expertos independientes que evaluaron los datos cuidadosamente y descartaron los resultados en los que los anticuerpos maternos podían ser la causa de la positividad. En el enfoque de criterios rigurosos, se aplicó un procedimiento de juicio similar. En resumen, la infección aguda según los criterios rigurosos era como sigue:

- una seroconversión desde título 0 hasta título 4 o superior
- el título es 16 en al menos una de las siguientes muestras
- 40 - todas las muestras de seguimiento permanecen positivas

Además de usar estos intervalos de tiempo separadamente, también se realizaron análisis al combinar entre sí algunos de estos intervalos.

45 Se muestran datos para los dos serotipos (CBV1 y CBV2) identificados por ser de riesgo. La cronología de las infecciones provocadas por el serotipo de riesgo CBV1 en estos intervalos de tiempo se resume en las Tablas 2 y 3. Estos análisis se realizaron usando los criterios relajados y los criterios medios y el efecto del riesgo de infección se analizó al comparar su frecuencia en diferentes intervalos de tiempo con la del intervalo cero (véase anteriormente). Se realizaron análisis estadísticos básicos, es decir, las clases 0-3 frente a 4 y los análisis de sensibilidad 1 y 2.

ES 2 643 696 T3

Tabla 2. Análisis de regresión logística condicional de la cronología de CBV1, otros intervalos frente al intervalo 0. Enfoque de criterios relajados con las clases 0-3 frente a 4 y análisis de sensibilidad 1 y 2.

CBV1	Razón de momios	Valor P	Intervalo de Conf. al 95%	
Clase 0-3 frente a 4				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	1,77	0,064	0,97	3,25
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	2,24	0,007	1,25	4,00
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	3,56	< 0,001	1,92	6,62
Sensibilidad 1, Clase 0-2 frente a 4				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,89	0,724	0,46	1,72
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	1,25	0,468	0,68	2,31
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	2,19	0,018	1,15	4,17
Sensibilidad 2, Clase 0-1 frente a 4				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	1,19	0,684	0,51	2,79
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	0,98	0,950	0,47	2,03
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	2,09	0,067	0,95	4,59

5 Tabla 3. Análisis de regresión logística condicional de la cronología de CBV1, otros intervalos frente al intervalo 0. El enfoque de criterios medios con las clases 0-3 frente a 4 y análisis de sensibilidad 1 y 2.

CBV1	Razón de momios	Valor P	Intervalo de Conf. al 95%	
Clase 0-3 frente a 4				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	1,62	0,262	0,70	3,75
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	0,77	0,417	0,41	1,44
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	2,09	0,002	1,32	3,33
Sensibilidad 1, Clase 0-2 frente a 4				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	1,14	0,795	0,41	3,17

CBV1	Razón de momios	Valor P	Intervalo de Conf. al 95%	
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	0,66	0,307	0,30	1,46
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	2,10	0,007	1,23	3,57
Sensibilidad 2, Clase 0-1 frente a 4				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,70	0,629	0,16	3,02
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	0,36	0,078	0,11	1,12
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	1,44	0,342	0,68	3,05

De forma interesante, en estos análisis las infecciones por CBV1 se encuentran claramente más a menudo en el caso de niños según la hipótesis de riesgo con infecciones que se producen próximas en el momento de la seroconversión de autoanticuerpos (en el intervalo de tiempo 6-0 meses antes de la fecha de AAB+). El resultado es el mismo en todos los análisis, excepto que en el análisis de sensibilidad 2 la significación estadística se pierde. Debido a que en estos análisis se han aceptado todos los resultados de anticuerpos positivos (probablemente incluyendo hallazgos positivos falsos), excepto los anticuerpos maternos en los análisis de criterios medios, es esencial comparar estos resultados con los obtenidos usando criterios rigurosos para las infecciones (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de regresión logística condicional de la cronología de CBV1, otros intervalos frente al intervalo 0. Enfoque de criterios rigurosos.

CBV1	Razón de momios	Valor P	Intervalo de Conf. al 95%	
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,67	0,455	0,24	1,89
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	1,38	0,491	0,55	3,46
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	3,76	0,001	1,68	8,44

En este ensayo, se ha retirado un gran número de datos para excluir todos los posibles positivos erróneos. Los resultados muestran que se observa una curva creíble de respuesta a la dosis, destacando la importancia del intervalo de tiempo 6-0 meses antes de la fecha de AAB+ y proporcionando un efecto del riesgo definido de CBV1 con resultados estadísticos convincentes. Lo más importante, debido a que se observaba que el mismo intervalo de 6-0 meses antes de la fecha de AAB+ era estadísticamente significativo en los enfoques de criterios relajados, medios y rigurosos, estos resultados consolidan este período de tiempo como uno crítico para la infección por CBV1 como un riesgo para inducir T1D. Los criterios rigurosos y los criterios relajados se presentan conjuntamente en la Figura 2, que muestra OR de CBV1 en diferentes intervalos de tiempo antes de la fecha de AAB+, Izquierda: criterios rigurosos, Derecha: criterios relajados (clase 0-3 frente a 4, sensibilidad 1, sensibilidad 2). Las curvas de respuesta a la dosis se pueden observar con ambos enfoques, siendo las más sobresalientes en los análisis de sensibilidad 1 de criterios rigurosos y criterios relajados.

En un análisis, se observaron las respuestas de anticuerpos de niños de 1,5 años. Además de la muestra de 1,5 años, también se analizaron las muestras de sangre del cordón umbilical para estudiar si los niños habían adquirido anticuerpos protectores pasivamente de sus madres. En este análisis, se encontró que si el niño no estaba protegido por anticuerpos maternos y tenía una infección por CBV1 después de menos de 1,5 años desde el nacimiento, el efecto de riesgo del CBV1 era extremadamente claro (OR = 3,5, P < 0,03) según se muestra en la Figura 3. Este análisis se realizó usando la clasificación 0-3 frente a 4.

A fin de entender el significado de este resultado, se interpretará en cuanto al riesgo atribuible a la población (PAR) que estima la proporción de casos de diabetes tipo 1 que se podrían evitar por la vacuna para CBV1 en la población. Suponiendo que la OR sea 3,76 (= resultado de los criterios rigurosos para el intervalo 6-0 meses antes de la fecha de AAB+) y la prevalencia de la infección por CBV1 sea 50% según se indicaba por la prevalencia de anticuerpos para CBV1 en el momento AAB+ en sujetos de control, la ecuación de PAR da como resultado 58% para CBV1 solo (Figura 4). La Figura 4 muestra el riesgo atribuible a la población (PAR) para CBV1 calculado usando una OR de 3,76 y una prevalencia (Pc) de 50% que representa la seroprevalencia en el momento de la seroconversión de autoanticuerpos en sujetos de control.

En el siguiente análisis, se combinaron los intervalos de tiempo 6-0 y 12-6. El efecto de riesgo de CBV1 era significativo también en el análisis de intervalos de tiempo combinados (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de regresión logística condicional de la cronología de CBV1, intervalo 12-0 frente al intervalo 0. Enfoque de criterios rigurosos.

CBV1	Razón de momios	Valor P	Intervalo de Conf. al 95%	
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,66	0,434	0,24	1,85
12-0 meses antes de la fecha de AAB+	2,46	0,004	1,33	4,53

Debido a que el efecto de riesgo más fuerte se observó en el intervalo de 6-0, este período de tiempo se analizó usando otro tipo de comparación. En lugar de compararlo frente al intervalo 0 (lo que se hizo en los análisis previos), este intervalo se comparó con todos los otros intervalos en combinación. De nuevo, los hallazgos previos que muestran la importancia crítica de este intervalo de tiempo eran apoyados por este análisis (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de regresión logística condicional de la cronología de CBV1, intervalo 6-0 frente a otros intervalos de tiempo combinados. Enfoque de criterios rigurosos.

CBV1	Razón de momios	Valor de P	Intervalo de Conf. al 95%	
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	3,78	0,001	1,69	8,43

Análisis de seroneutralización de múltiples momentos incluyendo además CBV2

En este análisis, también se analizó el serotipo CBV2 en una disposición de múltiples momentos similar a CBV1.

Cronología de las infecciones

Para clarificar la posible cronología de infecciones de subgrupos de CBV, se seleccionaron los mismos momentos para los análisis de seroneutralización que se describen anteriormente.

Los resultados presentados posteriormente se basan en el análisis de seroneutralización de aproximadamente 2.000 muestras. A fin de estudiar la cronología de las infecciones provocadas por los seis serotipos de CBV, las infecciones reconocidas se clasificaron en diferentes intervalos de tiempo con relación a los datos de seroconversión para positividad a autoanticuerpos (fecha de AAB+). Los intervalos usados se numeraron de 0 a 3 según se describe anteriormente.

Se usaron los mismos enfoques de criterios relajados, medios y rigurosos que se describen anteriormente. Se realizaron análisis estadísticos usando regresión logística condicional. Puesto que se han añadido algunos resultados de laboratorio adicionales a los resultados, también se muestran aquí para CBV1. Los resultados de análisis estadísticos para serotipos de CBV se muestran en las Tablas 7-8.

Tabla 7. Análisis cronológico de infecciones por CBV1. Enfoque de criterios relajados con las clases 0-3 frente a 4.

CBV1	Razón de momios	Valor P	Intervalo de Conf. al 95%	
Clase 0-3 frente a 4				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	1,89	0,035	1,05	3,40
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	2,27	0,005	1,28	4,03
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	3,54	<0,001	1,95	6,42

Tabla 8. Análisis cronológico de infecciones por CBV2. Enfoques de criterios relajados, medios y rigurosos con las clases 0-3 frente a 4.

CBV2	Razón de momios	Valor P	Intervalo de Conf. al 95%	
Criterios relajados				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,79	0,441	0,44	1,43
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	1,38	0,236	0,81	2,34
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	2,32	0,001	1,40	3,84
Criterios medios				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,80	0,523	0,41	1,58
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	1,02	0,946	0,54	1,93
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	2,29	0,001	1,43	3,66
Criterios rigurosos				
Más de 12 meses antes de la fecha de AAB+	0,88	0,838	0,26	3,00
12-6 meses antes de la fecha de AAB+	1,00	0,994	0,33	3,03
6-0 meses antes de la fecha de AAB+	2,44	0,059	0,97	6,15

5

Conclusiones

Además de CBV1, también se encontró que el CBV2 estrechamente relacionado era un virus de riesgo en análisis de múltiples momentos, especialmente en los 6-0 meses antes del intervalo de tiempo AAB+. Así, los análisis de múltiples momentos producían un buen segundo candidato para la vacuna preventiva.

10 También se calculó el PAR para CBV2 usando criterios relajados OR=2,26 y la seroprevalencia de 48% en la población de fondo, según esto, se terminó con PAR=37% (Figura 4). El resultado indica que una combinación de cóctel vacunal de CBV1 y CBV2 es la más interesante. Estos dos virus pueden conducir a un producto que tiene un

efecto importante para prevenir el comienzo de la diabetes tipo 1. Conjuntamente, los resultados indican que CBV2 también es un virus de riesgo asociado con la patogénesis de T1D y por lo tanto útil en el desarrollo de la vacuna.

Análisis de seroneutralización de múltiples momentos que incluye además CBV6

- 5 En este análisis, también se analizó el serotipo CBV6 en una disposición de múltiples momentos similar a CBV1 y CBV2. Sin embargo, en este caso, además del análisis de cohortes completo, también se realizaron separadamente los análisis para cada género.

Cronología de las infecciones.

Para clarificar la posible cronología de infecciones por subgrupos de CBV, se seleccionaron los mismos momentos para los análisis de seroneutralización que se describen anteriormente.

- 10 Los resultados presentados posteriormente se basan en el análisis de seroneutralización de aproximadamente 2.000 muestras. A fin de estudiar la cronología de infecciones provocadas por los serotipos de CBV, las infecciones reconocidas se clasificaron a diferentes intervalos de tiempo con relación a la fecha de seroconversión en positividad a autoanticuerpos (fecha AAB+). Los intervalos usados se numeraron de 0 a 3 según se describe anteriormente.

- 15 Se usaron los mismos enfoques de criterios relajados, medios y rigurosos que se describen anteriormente. Se realizaron análisis estadísticos usando regresión logística condicional. Los resultados de los análisis estadísticos para CBV6 se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Análisis cronológico de infecciones por CBV6 para toda la cohorte y separadamente para hembras y varones. Enfoques de criterios relajados, medios y rigurosos con las clases 0-3 frente a 4.

Meses antes de AAB+	Relajados			Medios			Rigurosos					
	OR	P	Intervalo Conf. 95%	OR	P	Intervalo Conf. 95%	OR	P	Intervalo Conf. 95%			
Ambos géneros			CBV6			CBV6			CBV6			
> 12	0,96	0,87	0,56	1,65	1,19	0,58	0,65	2,16	0,67	0,62	0,13	3,3
12 - 6	1,54	0,09	0,94	2,54	1,32	0,33	0,76	2,32	0,5	0,39	0,11	2,38
6 - 0	1,35	0,23	0,82	2,22	1,35	0,23	0,83	2,2	1,16	0,84	0,28	4,86
Niñas			CBV6			CBV6			CBV6			
> 12	0,57	0,29	0,20	1,62	0,69	0,51	0,22	2,11	nd	nd	nd	nd
12 - 6	2,14	0,06	0,96	4,77	1,39	0,47	0,57	3,39	nd	nd	nd	nd
6 - 0	2,42	0,05	1,02	5,78	2,69	0,03	1,09	6,60	2,00	0,49	0,13	32,02
Niños			CBV6			CBV6			CBV6			
> 12	1,23	0,53	0,65	2,32	1,59	0,21	0,77	3,28	1,33	0,75	0,22	7,98
12 - 6	1,23	0,53	0,64	2,38	1,27	0,52	0,61	2,66	0,67	0,62	0,13	3,31
6 - 0	0,99	0,97	0,53	1,85	0,96	0,89	0,52	1,76	0,97	0,97	0,18	5,32

Conclusión

5 Aunque CBV6 se encontró generalmente como un serotipo protector en un análisis de un solo momento AAB+, en los análisis de múltiples momentos mostraba una tendencia al riesgo en el intervalo de tiempo 12-6 meses antes del intervalo de tiempo AAB+. Por lo tanto, la importancia de CBV6 se estudió con más detalle y se llevó a cabo el mismo análisis cronológico separadamente para hembras y varones. Los resultados de este análisis mostraban que la tendencia al riesgo observada del CBV6 en toda la cohorte se asociaba intensamente con el género femenino en ambos intervalos de tiempo 12-6 meses y 6-0 meses antes del intervalo de tiempo AAB+. En contraste, para los varones no había evidencia de riesgo asociado a CBV6. Así, en conjunto, CBV6 puede aparecer como un serotipo protector, pero cuando se analiza una cierta subcohorte, tal como las hembras, se puede convertir en un virus de riesgo en dicha subcohorte.

Ejemplo 2

Una vacuna inactivada de CBV1 protege a los ratones contra viremia e infección del páncreas

Método

15 Se produjo una vacuna inactivada mediante amplificación de CBV1 en células Vero, seguido por purificación con sacarosa e inactivación con formol. La dosis de la vacuna se expresa como el contenido inicial en virus infeccioso (equivalente CCID₅₀).

20 Ratones BALB/c macho y hembra, que previamente se observaba que eran sensibles a la infección por CBV1, se inmunizaron mediante la vía i.m. con tres inyecciones de CBV1 inactivado con formol en D0, D21 y D35. Dos dosis de la vacuna (4x10⁴ y 2x10⁵ eq CCID₅₀) se evaluaron con respecto a la inmunización de ratones. Una semana después de la última inmunización, los ratones se estimularon con CBV1 vivo a través de la vía i.p. La viremia y la infección del páncreas se comprobaron en ratones inmunizados y de control mediante la titulación genómica de CBV1 de muestras de sangre y homogenados tisulares de páncreas.

Resultados

25 La inmunogenicidad de la vacuna se evaluó en primer lugar al analizar la inducción de anticuerpos neutralizadores en ratones individuales. Los títulos medios obtenidos para cada grupo de 5 ratones se presentan en la Tabla 10.

Eran detectables anticuerpos neutralizadores en todos los grupos inmunizados después de 2 inyecciones (D35) fuera cual fuera la dosis de vacuna usadas para la inmunización. Después de la finalización de las 3 administraciones de vacuna, todos los ratones inmunizados mostraban títulos de anticuerpos neutralizadores cuando se usaba la dosis de vacuna de 2x10⁵ eq CCID₅₀.

30 Tabla 10. Una vacuna de CBV1 inactivada induce anticuerpos neutralizadores coherentes en los ratones

Dosis de vacuna (eq CCID ₅₀)	Títulos de anticuerpos neutralizadores				
	D2	D21	D35	D42	
♂	4x10 ⁴	< 1/20	< 1/20	1/20	1/44
	2x10 ⁵	< 1/20	< 1/20	1/24	1/44*
	PBS (sin tratar)	< 1/20	< 1/20	< 1/20	< 1/20
♀	4x10 ⁴	< 1/20	< 1/20	1/24	1/144
	2x10 ⁵	< 1/20	< 1/20	1/28	1/76*
	PBS (sin tratar)	< 1/20	< 1/20	< 1/20	< 1/20

*todos los ratones sensibles

El efecto protector de la vacuna se evaluó a continuación después de una estimulación con CBV1 vivo administrado en una dosis infecciosa que se muestra que induce una viremia marcada en D2 y una replicación del virus en el páncreas hasta D7.

35 En contraste con los ratones sin tratar, todos los ratones inmunizados se protegían de la infección por CBV1 según se demostraba por la ausencia de virus detectable en sangre (Figura 5) y en el páncreas (Figura 6) en los días siguientes a la estimulación ip.

Conclusión

La vacuna de CBV1 inactivada protege contra la viremia y la replicación viral en el páncreas provocadas por CBV1

vivo. Como la inducción de la autoinmunidad después de la infección se ha relacionado con la inflamación provocada por la replicación viral (ref Horwitz et al, Nat Med 1998; Zipris Clin Immunol 2009;), la vacuna de CBV1 puede proteger de la autoinmunidad inducida por CBV1.

Ejemplo 3

5 Infección con virus y diabetes en ratones NOD transgénicos SOCS-1

Se usó un modelo recientemente desarrollado para diabetes tipo 1 inducida por enterovirus con ratones que expresan el supresor de la señalización de citocina-1 (SOCS-1) en células β pancreáticas. Al expresar SOCS-1, las células β pancreáticas pierden su capacidad para responder a interferones y por eso también su capacidad para protegerse contra el virus. Un análisis de los páncreas procedentes de animales transgénicos SOCS-1 infectados (denominados aquí ratones SOCS-1-Tg NOD) demuestra que la diabetes es el resultado de la destrucción de células β (Flodstrom, M. et al., 2002. Nat Immunol 3(4), 373-82; Flodstrom, M. et al., 2003. Diabetes 52(8), 2025-34).

10

Ratones y cría: Todos los ratones se criaron y se alojaron bajo condiciones libres de patógenos específicas. Los ratones SOCS-1-Tg NOD se criaron como heterocigotos y se cribaron con respecto a la presencia del transgén SOCS-1 mediante PCR.

15

Infecciones por virus

Ratones de 8 a 10 semanas de edad fueron infectados con una inyección intraperitoneal (i.p.) de CBV1 (10^1 , 10^3 - 10^8 , and 4×10^8 CCID50/animal). Se realizaron medidas del peso y la glucosa en sangre venosa sobre ratones sin ayunar con intervalos de 1-2 días durante la fase aguda de la infección (aprox. día 3-12 p.i.) y posteriormente de forma semanal. Los animales se consideraban diabéticos cuando tenían dos medidas de glucosa en sangre consecutivas > 13 mM. Los animales diabéticos fueron sacrificados el mismo día que se realizaba la segunda lectura. Todos los animales no diabéticos fueron seguidos hasta al menos 21 días después de la infección (p.i.). Los páncreas se recuperaron después del sacrificio y se fijaron en formalina al 4% para la histología.

20

Histología e inmunohistoquímica: Se elaboraron secciones en parafina ($4 \mu\text{m}$) a partir de páncreas seleccionados y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) o con anticuerpos primarios contra insulina de cobaya o contra glucagón de rata (DAKO Cytomation, Estocolmo, Suecia), según se describe previamente en, p. ej. (Flodstrom et al., 2002 anteriormente).

25

Compendio de resultados obtenidos

Según el plan, ratones SOCS-1-Tg NOD se estimularon con diferentes dosis de CBV1 (10^1 , 10^3 - 10^8 y 4×10^8 CCID50/animal). Las infecciones eran bien toleradas sin efectos o con efectos pequeños sobre los pesos de los animales. Algunos ratones SOCS-1-Tg NOD se volvían diabéticos rápidamente después de la infección, con tal incidencia más alta (50%) obtenida con la dosis 4×10^8 CCID50/animal (Tabla 11).

30

Un análisis histológico de páncreas seleccionados demostró que los ratones que desarrollaban diabetes habían perdido la mayoría, pero no la totalidad, de su masa de células β . Algún islote carecía completamente de células positivas a insulina mientras que otros todavía contenían células teñidas positivamente con el anticuerpo para insulina.

35

Conclusiones y comentarios

El CBV1 desencadenaba diabetes en ratones SOCS-1-Tg NOD aunque la penetración de la enfermedad era como mucho 50% (4×10^8 CCID50/animal, $n = 2$). La diabetes parecía, al menos en parte, ser el resultado de una destrucción de las células β pancreáticas ya que los animales que habían desarrollado diabetes tenían islotes bien que carecían de células β positivas a insulina o bien islotes con números de células positivas a insulina inferiores a los normales. Los islotes en ratones SOCS-1-Tg NOD que no desarrollaban diabetes parecían normales, algunos con infiltrados linfocíticos circundantes que se observan comúnmente en ratones SOCS-1-Tg y no Tg NOD a esta edad.

40

Tabla 11. Incidencia de diabetes en ratones SOCS-1-Tg NOD y NOD infectados con CBV1

Dosis de virus (CCID50/animal)	Ratones SOCS-1-Tg NOD			
	Animales diabéticos del total	Animales diabéticos (porcentaje)	Nº de hembras	Nº de machos
10^1	0/6	0	6	0
10^3	0/5	0	3	2
10^4	1/6	17	2	4

Ratones SOCS-1-Tg NOD				
Dosis de virus (CCID50/- animal)	Animales diabéticos del total	Animales diabéticos (porcentaje)	Nº de hembras	Nº de machos
10 ⁵	1/7	14	7	0
10 ⁶	1/8	13	8	0
10 ⁷	2/7	29	0	7
10 ⁸	2/5	40	0	5
4 x 10 ⁸	1/2	50	0	2

Ejemplo 4

Carácter de riesgo de CBV2

5 En este estudio en conjunto se recogieron 284 muestras de suero de niños de un año de edad (intervalo 321 - 430 días) y se estudiaron sus respuestas de seroneutralización. Los resultados de la seroneutralización de la fecha de seroconversión de autoanticuerpos realizada con seis serotipos de CBV se compararon con los resultados de las muestras procedentes de la fecha de diagnóstico de la diabetes tipo 1 tomados de los mismos niños y usando los mismos virus. En este análisis, el grupo de referencia consistía en niños que eran negativos para un virus dado en
10 ambas muestras. Los resultados se muestran en la Tabla 12. Se detectó una conexión entre las infecciones por CBV2 y el riesgo de diabetes tipo 1 cuando se comparaban los datos del intervalo entre las muestras de la fecha de seroconversión de autoanticuerpos y las muestras tomadas en la fecha del diagnóstico de la diabetes. CBV2 mostraba una tendencia al riesgo con OR alta que indicaba que puede acelerar el avance del proceso autoinmunitario después de su inicio.

15 Tabla 12. Análisis de regresión logística condicional de 6 serotipos de CBV. Se comparó el intervalo de muestras entre la fecha de la seroconversión de autoanticuerpos y la fecha del diagnóstico de la diabetes tipo 1. Enfoque de criterios relajados: clases 0-3 frente a 4. Los cambios de negativo a positivo se han analizado frente al negativo a negativo del grupo de referencia.

OR	P	Intervalo de Conf. al 95%	
CBV1			
0,82	0,797	0,18	3,78
CBV2			
6,04	0,106	0,68	53,32
CBV3			
0,78	0,778	0,14	4,36
CBV4			
0,35	0,339	0,04	3,02
CBV5			
0,18	0,108	0,023	1,45
CBV6			
0,89	0,813	0,35	2,27

Ejemplo 5

Reactividad cruzada de anticuerpos dentro de serotipos de CBV

Se analizó la reactividad cruzada de anticuerpos dentro de los serotipos de CBV usando una cohorte del estudio de seroneutralización con dos series de muestra. Los anticuerpos contra serotipos de CBV se midieron en el ensayo de seroneutralización de placas y las muestras de suero se valoraron hasta su valor del punto final. Se analizaron muestras de 23 niños que tenían anticuerpos (valor al menos 1/16) contra CBV1, CBV3 o CBV6. Para el resto de estos virus, era un nivel inferior pero detectable (clases 1-3). Las otras series de muestra incluían ocho niños que tenían uno de los serotipos de CBV detectados en una muestra de heces. En los ocho niños, la respuesta de anticuerpos se indujo específicamente con títulos altos (título al menos 1:512) frente al serotipo detectado en las heces. Aquí, la muestra de suero se recogió inmediatamente antes de o justo después de la muestra de heces positiva a CBV y la respuesta de anticuerpos seguía alta en las muestras de seguimiento. Cuando los niños seleccionados para estos grupos se observaban como un grupo, se observó una tendencia clara. Según estos análisis de cohortes, CBV3 mostraba reactividad cruzada con CBV1, CBV2 y CBV6 (Tabla 13).

Tabla 13. Las principales tendencias de los picos temporales de bajo título que sugirien una reactividad cruzada entre diferentes serotipos de CBV. Se encontraron respuestas homotípicas a CBV3 en 18 niños (procedentes de 65 muestras) de los que 12 niños (en 26 muestras) también tenían respuestas temporales de bajo título en CBV1, CBV2 o CBV6.

Respuesta homotípica	Respuesta temporal de bajo título en	Número de muestras con respuesta temporal de bajo título	Número de niños que tenían una respuestas temporal de bajo título
CBV3	CBV1	9	4
	CBV2	4	4
	CBV6	13	7

Se realizó otro ensayo de neutralización cruzada usando sueros monoespecificos producidos contra serotipos CBV1-6 en monos (cepas específicas producidas por Swedish Institute for Communicable Diseases) y cepas de referencia de la ATCC CBV1 CBV3-6 en caballos (adquiridas de ATCC). Los análisis se realizaron con las cepas de virus CBV disponibles. Los análisis de neutralización cruzada realizados con sueros de mono hiperinmunizados (grupo de anticuerpos nº 1) mostraban una fuerte reactividad cruzada entre virus CBV4 y antisueros producidos contra todos los otros serotipos de CBV (Tabla 14). Además, el antisuero para CBV1 reaccionaba cruzadamente de forma débil con CBV6 y, viceversa, el antisuero CBV6 mostraba una reactividad cruzada con el virus CBV1. Otro estudio de neutralización cruzada realizado con los sueros de caballo hiperinmunizados (sueros de la ATCC) mostraba que el antisuero para CBV6 reaccionaba cruzadamente con los virus tanto CBV1 como CBV3 (Tabla 15). No se observó reacción al contrario para antisueros para CBV1 o CBV3 contra el virus CBV6. Tampoco se observó reactividad cruzada con CBV4, lo que está en contraste con los resultados obtenidos con el grupo de anticuerpos 1.

Tabla 14. El estudio de neutralización cruzada realizado con los sueros de mono hiperinmunizados (grupo de anticuerpos nº 1 del Swedish Institute for Communicable Diseases, Estocolmo, Suecia). Se usa 75% de inhibición de placas como un valor liminar para la inhibición

	CBV1 V19	CBV2 V20	CBV3 V21	CBV4 (WT) V22	CBV1 (cepa ref.) V22RR	CBV5 V23	CBV6 V24
Antisuero para CBV1	1:8.000*	NO	NO	1:2.048 4**	1:2.048 4	1:8 1.000	1:16 500
Antisuero para CBV2	NO	1:4.000	NO	1:8 500	NO	NO	NO
Antisuero para CBV3	NO	NO	1:8.000	1:2.048 4	1:128 62,5	1:16 500	NO

	CBV1 V19	CBV2 V20	CBV3 V21	CBV4 (WT) V22	CBV1 (cepa ref.) V22RR	CBV5 V23	CBV6 V24
Antisuero para CBV4	1:16 750***	NO	1:4 3.000***	1:8.000	1:16.000	1:4 3.000***	NO
Antisuero para CBV5	NO	NO	NO	1:2.048 4	1:2.048 4	1:8.000	NO
Antisuero para CBV6	1:4 4.000	NO	NO	1:1.024 16	1:256 62,5	NO	1:16.000

* Línea superior: Título con antisueros específicos de un serotipo (respuesta homotípica)

** Línea inferior: Cuántas veces el título específico del serotipo es superior al título reactivo cruzadamente no específico

- 5 *** Para calcular el título específico sobre el no específico para antisueros para CBV4, se ha usado la media de títulos específicos procedentes de dos cepas de CBV4 diferentes

NO = reactividad cruzada no detectada

Tabla 15. El estudio de neutralización cruzada realizado con los sueros de caballo hiperinmunizados (origen ATCC). Se usa 75% de inhibición de placas como un valor liminar para la inhibición

	CBV1 V19	CBV2 V20	CBV3 V21	CBV4 (WT) V22	CBV4 (cepa ref.) V22r	CBV5 V23	CBV6 V24
Antisuero para CBV1	1:128*	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Antisuero para CBV3	NO	NO	1:128	NO	NO	NO	NO
Antisuero para CBV4	NO	NO	NO	1:2.048	1:2.048	NO	NO
Antisuero para CBV5	NO	NO	NO	NO	NO	1:2.048	1:32 64**
Antisuero para CBV6	1:128 64**	NO	1:128 64**	NO	NO	NO	1:8.192

10

NO = reactividad cruzada no detectada

* Línea superior: Título con antisueros específicos de un serotipo (respuesta homotípica)

** Línea inferior: Cuántas veces el título específico del serotipo es superior al título reactivo cruzadamente no específico

15

Ejemplo 6

Análisis de secuencias

5 El objetivo de este estudio era identificar serotipos de enterovirus que provocan diabetes tipo 1 mediante un análisis de secuencias directo de muestras de suero recogidas de niños que habían sido seguidos desde el nacimiento hasta que se volvían positivos con respecto a autoanticuerpos asociados a la diabetes o desarrollaban diabetes tipo 1 clínica. El estudio se basaba en muestras de suero y plasma recogidas en un estudio de cohortes de nacimiento prospectivo, que incluía dos subcohortes de los niños. La cohorte 1 comprendía niños que se habían cribado con respecto a ARN de enterovirus en estudios académicos previos llevados a cabo en the University of Tampere. El objetivo era secuenciar todas las muestras positivas a enterovirus detectadas en esta cohorte. La cohorte 2 incluía a los mismos niños que se cribaban con respecto a la neutralización de anticuerpos para enterovirus en el estudio previo. El objetivo era cribar estos niños de la cohorte 2 con respecto a la presencia de ARN de enterovirus en el suero y secuenciar todas las muestras positivas al virus.

10 La secuenciación se realizó con RT-PCR semianidada usando cebadores específicos para la región VP1 del grupo de EV según se divulga en Nix et al., J Clin Microbiol. agosto de 2006; 44(8): 2698-704, y usando cebadores específicos de la región VP2 del grupo de EV según se divulga en Nasri et al. J Clin Microbiol. Agosto de 2007; 45(8): 2370-9.

15 En estos análisis, se combinaron los datos de la cohorte 1 y la cohorte 2. Esta cohorte combinada incluía 1.629 muestras procedentes de 241 niños "caso" y 4.066 muestras procedentes de 687 niños de control. En conjunto, 115 muestras eran positivas para enterovirus incluyendo 34 muestras positivas procedentes de los niños "caso" y 81 muestras positivas procedentes de los niños de control (Tabla 16).

Tabla 16. Número de muestras analizadas (N) y positivas para enterovirus (EV+) de los grupos del caso y de control en la cohorte combinada.

Cohorte combinada 1 y 2	Seguimiento total	Nacimiento-AAb	Intervalo de 6 meses antes de Aab	AAb-T1D
Caso (N)	4066	2668	1095	914
Control (N)	1629	1006	346	517
Caso (EV+)	81	58	18	16
Control EV(+)	34	20	9	9

25 Los análisis de secuenciación se dirigían a 91 muestras positivas para enterovirus conjuntas en la cohorte 1 y 24 muestras positivas para enterovirus en la cohorte 2. De estas 115 muestras positivas, 34 procedían de niños "caso" y 81 de niños de control. Estas muestras incluían 25 muestras procedentes de niños "caso" en la cohorte 1 y 9 muestras de niños "caso" en la cohorte 2, así como 66 muestras positivas a enterovirus de niños de control en la cohorte 1 y 15 muestras positivas a enterovirus procedentes de niños de control en la cohorte 2. También se realizaron análisis de la secuencia para algunas muestras, que se excluían del análisis estadísticos de los resultados de PCR de cribado. Todas las muestras de enterovirus se secuenciaron desde las regiones VP1 y VP2, lo que permite la identificación del serotipo. En conjunto, se secuenciaron satisfactoriamente 9 muestras de casos (26%) y 26 muestras de control (28%). Todas las muestras que eran satisfactorias en la secuenciación tanto de VP1 como de VP2 mostraban el mismo serotipo en una búsqueda por blast. Además, todas las muestras positivas a enterovirus se secuenciaron con respecto a la secuencia de 5-NCR amplificada por la RT-PCR de cribado.

30 La distribución de serotipos difería claramente entre los niños "caso" y los de control: En los niños "caso" predominaban serotipos de Coxsackie B y los serotipos de Coxsackie A eran raros, mientras que en los niños de control predominaban los serotipos de Coxsackie A. Ente los niños "caso", los virus CBV representaban 44% de todos los serotipos identificados, y entre los niños de control representaban solo 19% de todos los serotipos identificados (Tabla 17). Los serotipos de CBV identificados eran CBV3, CBV4 y CBV5 en ambos grupos.

Tabla 17. Proporción (%) de tipos de enterovirus detectados divididos en dos grupos: virus CBV y virus no CBV. Estos resultados se basan en la secuenciación de VP1 y VP2 en los sujetos "caso" y de control.

Grupo de virus	Casos	Controles
CBV (%)	44	19
no CBV (%)	56	81

Conclusión

5 El predominio de los serotipos de CBV en los sueros de niños "caso" indica que los virus del grupo de CBV están relacionados con la T1D y representan un papel en la patogénesis de la enfermedad. Este resultado junto con el criterio de valoración más fuerte (niños que avanzan hasta diabetes tipo 1 clínica en la cohorte 1), es decir riesgo estadísticamente significativo de infecciones por enterovirus en el intervalo de 6 meses antes de la fecha de seroconversión de autoanticuerpos, también indican una conexión causal entre las infecciones por CBV y el inicio del proceso autoinmunitario de tipo 1.

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna que comprende:
 - i) virus de Coxsackie B CBV1 y CBV2 en forma inactivada o en la forma de una vacuna subunitaria, una partícula pseudovírica (VLP), un ácido nucleico de dicho virus o una combinación de los mismos, y
 - 5 ii) al menos un virus de Coxsackie B seleccionado del grupo que consiste en CBV3, CBV4, CBV5 y CBV6 en forma inactivada o en la forma de una vacuna subunitaria, una partícula pseudovírica (VLP), un ácido nucleico de dicho virus o una combinación de los mismos para el uso en la prevención o el tratamiento de la diabetes tipo 1,
en donde el ácido nucleico de i) e ii) es un fragmento de ARN o ADNc viral que codifica el virus entero o una proteína viral individual.
- 10 2. La vacuna para el uso según la reivindicación 1, que comprende CBV1, CBV2, CBV3, CBV4, CBV5 y CBV6.
3. La vacuna para el uso según la reivindicación 1 o 2, en la que los CBV están inactivados.
4. La vacuna para el uso según la reivindicación 1 o 2, en la que el virus está en la forma de la vacuna subunitaria del CBV.
- 15 5. La vacuna para el uso según la reivindicación 1 o 2, en la que el virus está en la forma de la partícula pseudovírica (VLP) del CBV.
6. La vacuna para el uso según la reivindicación 1 o 2, en la que el virus está en la forma del ácido nucleico del CBV.
7. La vacuna para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además un excipiente y adyuvante farmacéuticamente aceptables.
8. Una vacuna que comprende:
 - 20 i) anticuerpos contra virus de Coxsackie B CBV1 y CBV2, y
 - ii) anticuerpos contra al menos un virus de Coxsackie B seleccionado del grupo que consiste en CBV3, CBV4, CBV5 y CBV6
para el uso en la prevención o el tratamiento de la diabetes tipo 1.
- 25 9. La vacuna para el uso según la reivindicación 8, que comprende anticuerpos contra CBV1, CBV2, CBV3, CBV4, CBV5 y CBV6.
10. La vacuna para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la vacuna es para ser administrada a un mujer embarazada, y opcionalmente posnatalmente al recién nacido.
11. La vacuna para el uso según la reivindicación 9, en la que el uso comprende la inmunización pasiva al administrar anticuerpos para los CBV.
- 30 12. Una composición contra el virus de Coxsackie B que comprende la vacuna según la reivindicación 8 para el uso en el tratamiento o la prevención de la diabetes tipo 1.

Figura 1

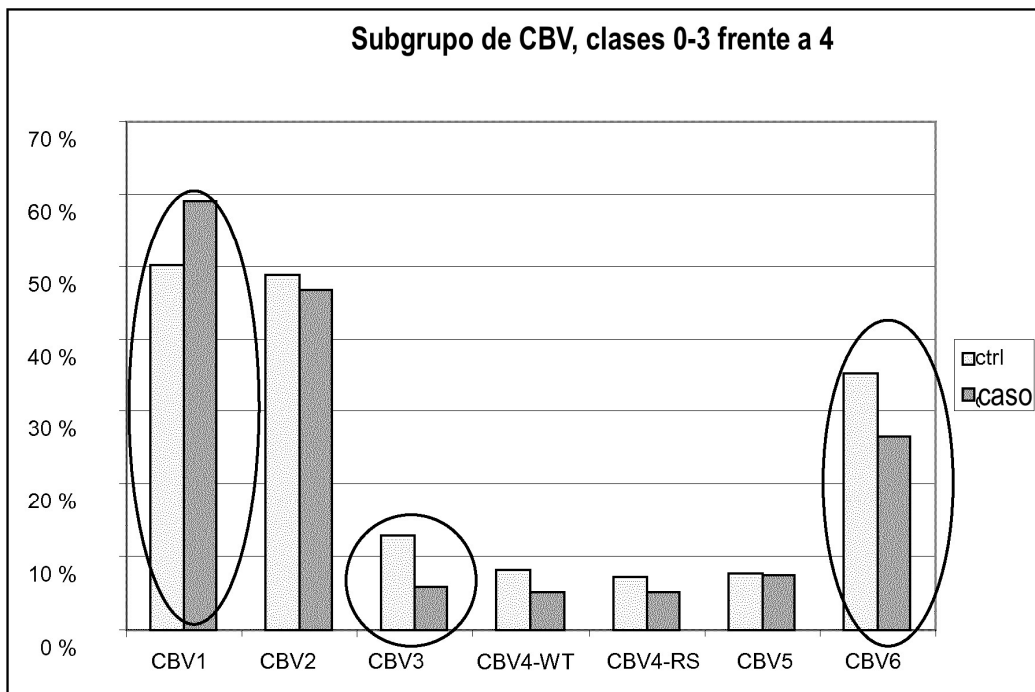
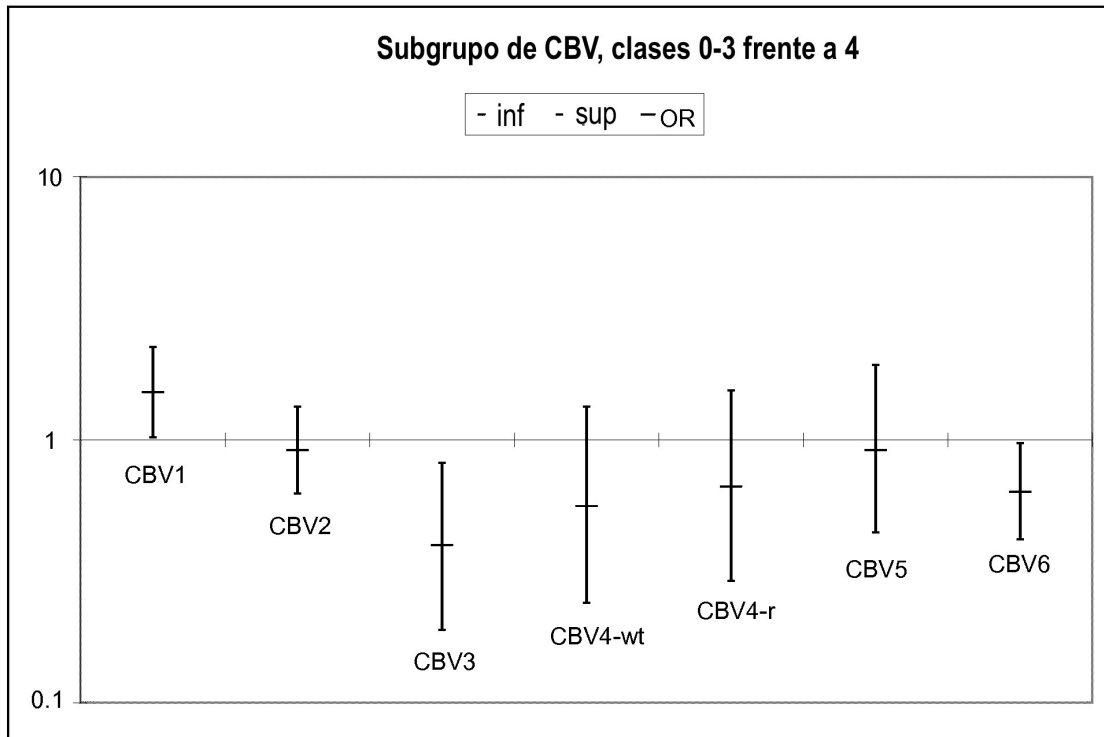


Figura 2

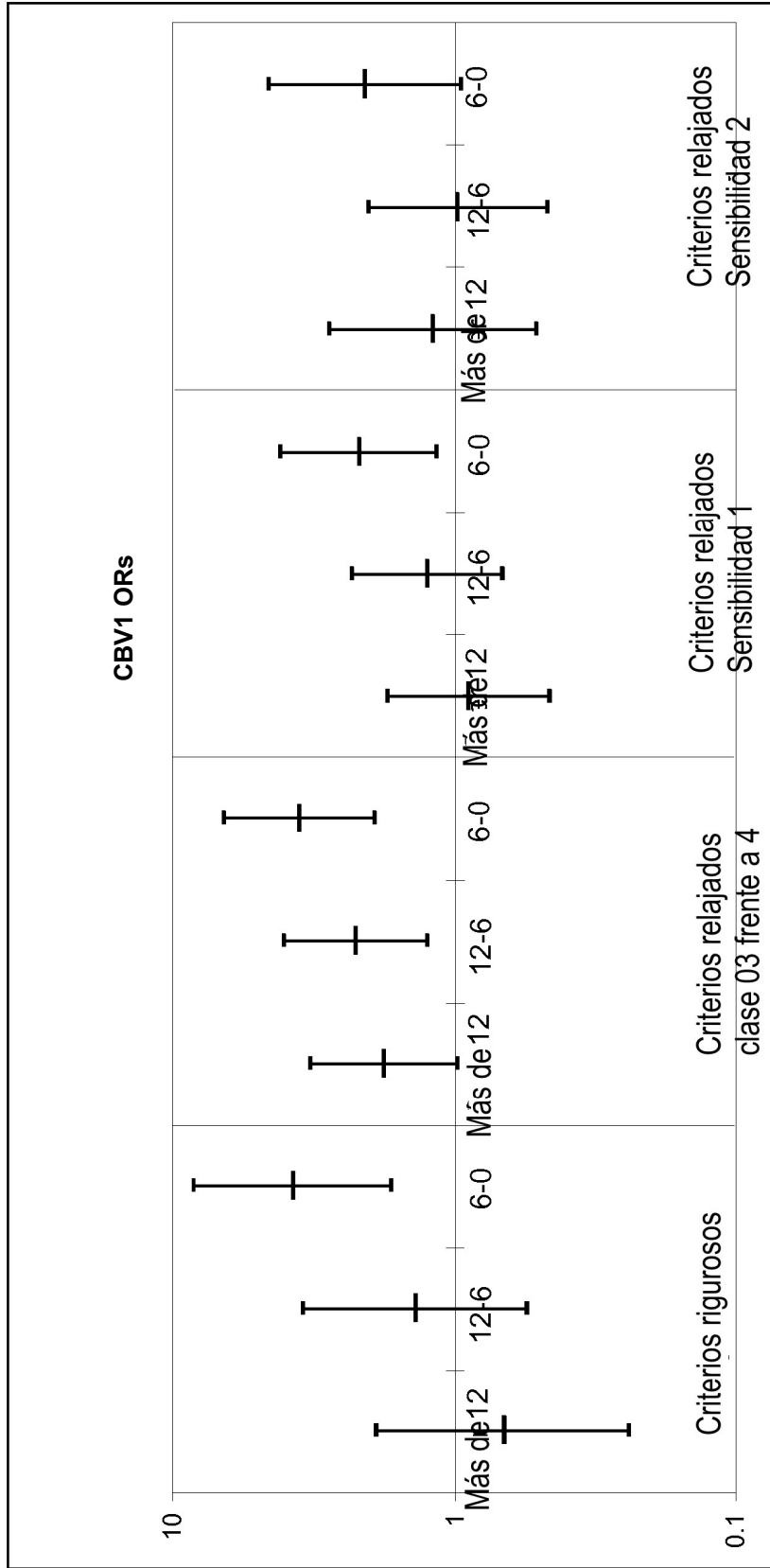
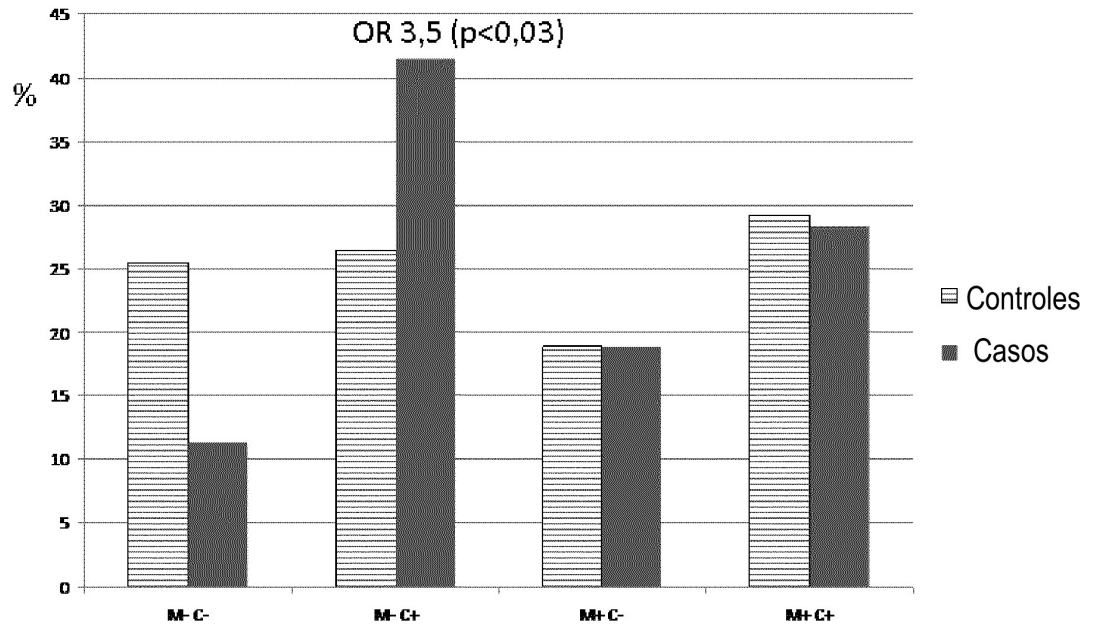


Figura 3



Anticuerpos para CBV1 maternos frente a infantiles

Figura 4

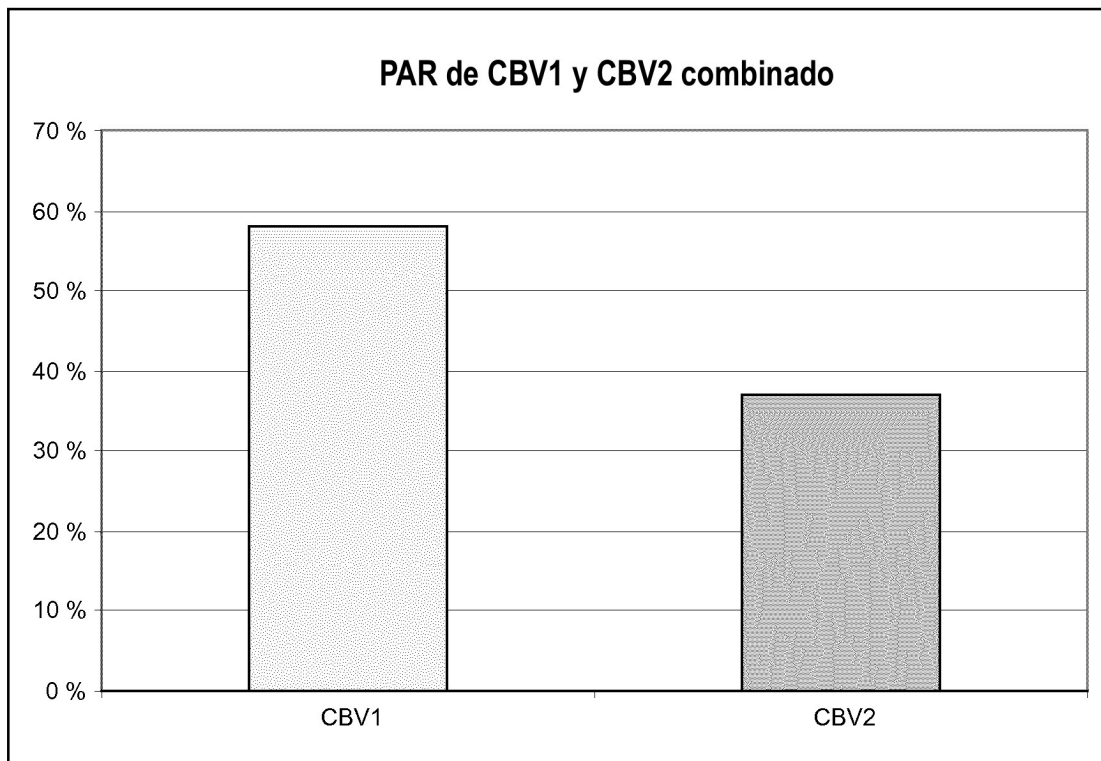


Figura 5

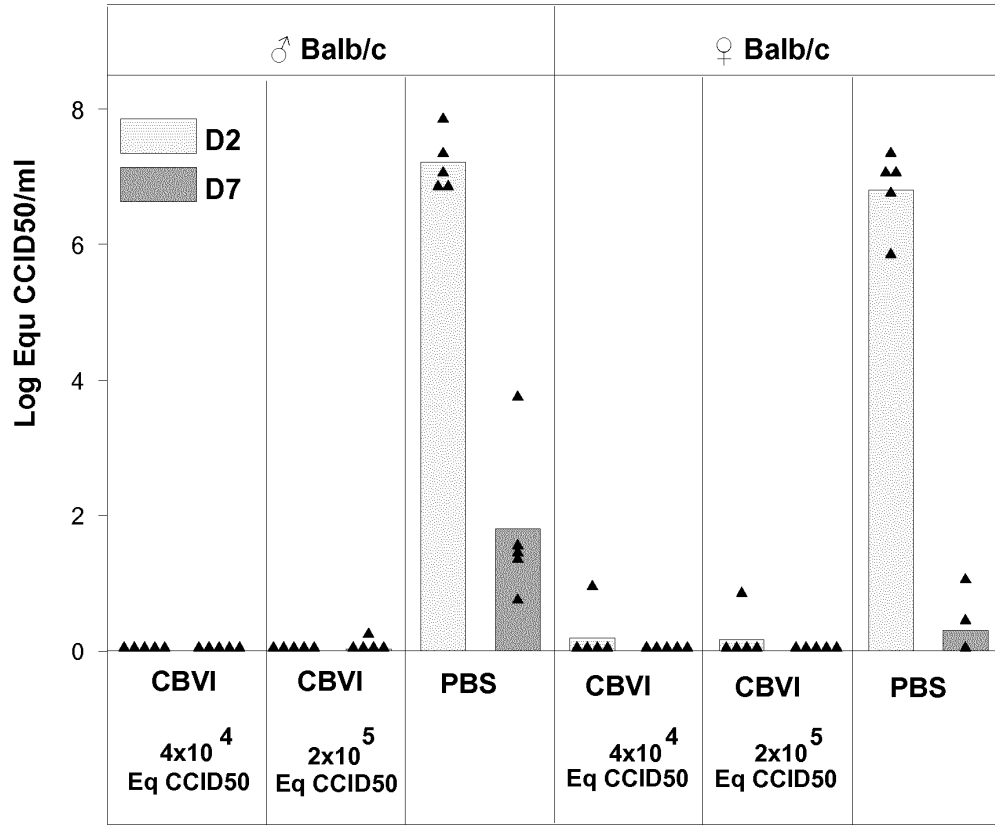


Figura 6

