República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021009234-0 A2

(22) Data do Depósito: 13/11/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 08/09/2021

(54) Título: COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS PARA TRATAMENTO DE HEPATITE B

(51) Int. Cl.: A61K 39/29; A61P 31/20; A61P 37/04.

(30) Prioridade Unionista: 13/11/2018 US 62/760,439.

(71) Depositante(es): VARIATION BIOTECHNOLOGIES INC.

(72) Inventor(es): DAVID EVANDER ANDERSON; TANVIR AHMED.

(86) Pedido PCT: PCT IB2019001230 de 13/11/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/099927 de 22/05/2020

(85) Data da Fase Nacional: 12/05/2021

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS PARA TRATAMENTO DE HEPATITE B. A presente divulgação fornece composições e métodos úteis para induzir uma resposta de células Th1 em um indivíduo que sofre de hepatite B. Como descrito nesse documento, as composições da divulgação compreendem HBsAg com proteínas S, Pré-S1 e Pré-S2 e um adjuvante de fosfato de alumínio. Em uma modalidade preferida, a composição imunogênica compreende pelo menos 20 ug/ml de antígeno HBsAg e a quantidade de antígeno não adsorvido é de pelo menos 30%.

COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS PARA TRATAMENTO DE HEPATITE B

Referência Cruzada com Pedidos Relacionados

[001] O presente pedido reivindica o benefício do pedido provisório US número 62/760.439, depositado em 13 de novembro de 2018, cujo conteúdo é incorporado nesse documento por referência em sua totalidade.

Campo da invenção

[002] Essa invenção está no campo de composições imunogênicas, em particular composições imunogênicas úteis para o tratamento de infecção por hepatite B.

Antecedentes

[003] A hepatite B é uma infecção viral que é o agente causador da doença hepática aguda e crônica. É transmitido em humanos através do contato com sangue ou outros fluidos corporais de um indivíduo infectado. A infecção por hepatite B é um problema de saúde generalizado e significativo que causa doença hepática crônica em mais de 250 milhões de pessoas e cerca de um milhão de mortes por ano em todo o mundo (Global Hepatitis Report 2017, Organização Mundial da Saúde). Após a infecção, a hepatite B causa uma fase aguda da doença, que não apresenta sintomas na maioria das pessoas. Aqueles que apresentam sintomas experimentam icterícia, fadiga e dor abdominal, com um pequeno subgrupo de pacientes apresentando insuficiência hepática aguda, que pode ser fatal. Após a infecção com hepatite B, o sistema imunológico do paciente pode eliminar o vírus resultando na cura, ou o paciente pode desenvolver uma infecção crônica por hepatite B. As consequências da hepatite B crônica são significativas, uma vez que 30% dos adultos cronicamente infectados acabam desenvolvendo cirrose e/ou câncer de fígado. A probabilidade

de desenvolver uma doença crônica diminui com a idade, com bebês tendo 90% de chance de infecção crônica, enquanto adultos saudáveis têm apenas 5%-10% de chance.

[004] Embora vacinas para infecção por hepatite B tenham sido buscadas, existe uma necessidade de tratamentos melhorados para pacientes com hepatite B crônica, particularmente tratamentos que são capazes de provocar uma resposta imunológica celular melhorada em indivíduos.

Sumário

[005] São fornecidas várias modalidades relacionadas a composições imunogênicas compreendendo um antígeno HBsAg compreendendo domínios de S, Pré-S1 e Pré-S2 e um adjuvante de fosfato de alumínio, usos das composições imunogênicas da revelação, métodos de indução de uma resposta de células Th1 pela administração das composições imunogênicas da revelação e métodos de tratamento da infecção por Hepatite B pela administração das composições imunogênicas da revelação.

[006] Em algumas modalidades, a presente revelação fornece uma composição imunogênica compreendendo um antígeno de envelope HBsAg compreendendo domínios de S, Pré-S1 e Pré-S2 (por exemplo, proteínas S, Pré-S1 e Pré-S2 descritas nesse documento) e um adjuvante de fosfato de alumínio. Em uma modalidade preferida, a presente revelação fornece uma composição imunogênica compreendendo pelo menos cerca de 20 μg/ml (por exemplo, pelo menos cerca de 30 μg/ml, pelo menos cerca de 40 μg/ml, pelo menos cerca de 50 μg/ml, ou pelo menos cerca de 60 μg/ml) de antígeno de envelope HBsAg compreendendo domínios de S, Pré-S1 e Pré-S2 e um adjuvante de fosfato de alumínio, em que a quantidade de antígeno não ligado é de pelo menos 30% (por exemplo, pelo menos cerca de

35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80% ou mais). Em uma modalidade particularmente preferida, a presente revelação fornece uma formulação de vacina compreendendo cerca de 20 μg/ml–60 μg/ml (por exemplo, cerca de 20 μg/ml, cerca de 30 μg/ml, cerca de 40 μg/ml, cerca de 50 μg/ml, ou cerca de 60 μg/ml) de antígeno HBsAg compreendendo domínios de S, Pré–S1 e Pré–S2 e um adjuvante de fosfato de alumínio, em que a quantidade de antígeno não ligado é de pelo menos cerca de 30% (por exemplo, em pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80% ou mais).

[007] Em algumas modalidades, as composições imunogênicas da revelação compreendem entre 62,5 μg/ml e 500 μg/ml de alumínio que está presente como adjuvante de fosfato de alumínio. Em uma modalidade preferida, as composições imunogênicas da revelação compreendem 500 μg/ml de alumínio como adjuvante de fosfato de alumínio. Em uma modalidade particularmente preferida, a composição imunogênica da revelação compreende 500 μg/ml de alumínio como adjuvante de fosfato de alumínio e 20 μg/ml de antígeno HBsAg tendo todas as três proteínas S, Pré–S1 e Pré–S2.

[008] Em outra modalidade, a presente revelação fornece uma composição imunogênica para provocar uma resposta de Th1 em um indivíduo, a referida composição compreendendo antígenos de envelope HBsAg compreendendo proteínas S, Pré–S1 e Pré–S2 e um adjuvante de fosfato de alumínio. Em uma modalidade preferida, a presente revelação fornece uma

composição imunogênica para provocar uma resposta de Th1 em um mamífero, a referida composição compreendendo pelo menos 20 μg/ml de antígenos de envelope HBsAg compreendendo proteínas S, Pré-S1 e Pré-S2 e um fosfato de alumínio adjuvante em que a quantidade de antígeno não ligado é de pelo menos 30%. Em uma modalidade particularmente preferida, a presente revelação fornece uma composição imunogênica para provocar uma resposta de Th1 em um mamífero, a referida composição compreendendo 20 μg/ml-60 μg/ml de antígeno HBsAg compreendendo as proteínas S, Pré-S1 e Pré-S2 e um adjuvante de fosfato de alumínio, em que a quantidade de antígeno não ligado é de pelo menos 30%. Em algumas modalidades, a composição imunogênica para provocar uma resposta de Th1 em um mamífero compreende entre 62,5 μg/ml e 500 μg/ml de alumínio que está presente como adjuvante de fosfato de alumínio. Em uma modalidade preferida, a composição imunogênica para provocar uma resposta de Th1 em um mamífero compreende 500 μg/ml de alumínio como adjuvante de fosfato de alumínio e 20 μg/ml-60 μg/ml de antígeno HBsAg compreendendo proteínas S, Pré-S1 e Pré-S2. Em uma modalidade particularmente preferida, a composição imunogênica para provocar uma resposta de Th1 em um mamífero compreende 500 μg/ml de alumínio como adjuvante de fosfato de alumínio e 20 μg/ml de antígeno HBsAg compreendendo proteínas S, Pré-S1 e Pré-S2.

[009] Em outra modalidade, a presente revelação fornece uma composição imunogênica para o tratamento da hepatite B em um indivíduo humano em necessidade da mesma, a referida composição compreendendo antígenos de envelope HBsAg compreendendo proteínas S, Pré-S1 e Pré-S2 e um adjuvante de

fosfato de alumínio. Em uma modalidade preferida, a presente revelação fornece uma composição imunogênica para o tratamento de Hepatite B em um indivíduo humano em necessidade da mesma, a referida composição compreendendo pelo menos 20 μg/ml de antígeno de envelope HBsAg compreendendo proteínas S, Pré-S1 e Pré-S2 e um adjuvante de fosfato de alumínio em que a quantidade de antígeno não ligado é de pelo menos 30%. Em uma modalidade particularmente preferida, a presente revelação fornece uma composição imunogênica para o tratamento da Hepatite B em um indivíduo humano em necessidade da mesma, a referida composição compreendendo 20 μg/ml-60 μg/ml de antígenos HBsAg compreendendo Proteínas S, Pré-S1 e pré-S2 e um adjuvante de fosfato de alumínio, em que a quantidade de antígeno não ligado é de pelo menos 30%. Em algumas modalidades, a composição imunogênica para o tratamento da hepatite B em um indivíduo humano em necessidade compreende 62,5 μg/ml a 500 μg/ml de alumínio que está presente como adjuvante de fosfato de alumínio. Em uma modalidade preferida, as composições imunogênicas para o tratamento de Hepatite B em um indivíduo humano em necessidade compreendem 500 μg/ml de alumínio como adjuvante de fosfato de alumínio e 20-60 μg/ml μg/ml de antígenos HBsAg compreendendo proteínas S, Pré-S1 e Pré-S2. Em uma modalidade particularmente preferida, as composições imunogênicas para o tratamento da Hepatite B em um indivíduo humano em necessidade compreendem 500 μg/ml de alumínio como adjuvante de fosfato de alumínio e 20 μg/ml μg/ml de antígenos HBsAg compreendendo proteínas S, Pré-S1 e Pré-S2.

[0010] A presente revelação também abrange o uso de pelo menos uma das composições imunogênicas da revelação na

preparação de uma composição farmacêutica destinada ao tratamento de infecções por hepatite B.

[0011] A presente revelação fornece adicionalmente composições farmacêuticas que compreendem as composições imunológicas da revelação para administração a um indivíduo em necessidade das mesmas.

[0012] A presente revelação também fornece um método para induzir uma resposta de Th1 em um mamífero, compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição da revelação.

[0013] A presente revelação também fornece um método para o tratamento de infecções por hepatite B, em particular infecção por hepatite B crônica, compreendendo a administração a um indivíduo em necessidade do mesmo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição da revelação.

[0014] Em qualquer um do(a)s aspectos ou modalidades descrito(a)s nesse documento, uma composição pode compreender uma proteína S (por exemplo, uma proteína S compreendendo ou consistindo em uma sequência de aminoácidos tendo cerca de 80%, 85%, 90%, 91%, 92% , 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1); uma proteína Pré-S2 (por exemplo, uma proteína Pré-S2 compreendendo ou consistindo em uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2); e uma proteína Pré-S1 (por exemplo, uma proteína Pré-S1 compreendendo ou consistindo em uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96

%, 97%, 98%, 99% ou 100% de identidade com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3). As modalidades descritas nesse documento podem compreender cerca de 75–90% em peso de proteína S, cerca de 2–8% em peso de proteína Pré–S1 e cerca de 5–15% em peso de proteína Pré–S2 (por exemplo, 83 +/– 3,3% de proteína S, 6 +/– 3% de proteína Pré–S1 e 11 +/– 3% de proteína Pré–S2).

[0015] Outras características, objetos e vantagens da presente revelação são evidentes na descrição detalhada a seguir. Deve ser entendido, no entanto, que a descrição detalhada, embora indique modalidades da presente revelação, é dada a título de ilustração apenas, não de limitação. Várias mudanças e modificações dentro do escopo da revelação se tornarão aparentes para aqueles habilitados na técnica a partir da descrição detalhada.

Listagem de Sequências

[0016] A seguir está uma lista de sequências referidas nesse documento:

a SEQ ID NO: 1 é uma pequena proteína da sequência de aminoácidos de HBsAG:

1	11	21	31
MENITSGFLG	**PLLVLQAGFF**	**LLTRILTIPQ**	**SLDSWWTSLN**
41	51	**61**	**71**
FLGGSPVCLG	**QNSQSPTSNH**	**SPTSCPPICP**	**GYRWMCLRRF**
81	91	**101**	**111**
IIFLFILLLC	**LIFLLVLLDY**	**QGMLPVCPLI**	**PGSTTTSTGP**
121	131	**141**	**151**
CKTCTTPAQG	**NSMFPSCCCT**	**KPTDGNCTCI**	**PIPSSWAFAK**
161	**171**	**181**	**191**
YLWEWGSVRF	**SWLSLLVPFV**	**QWFVGLSPTV**	**WLSVIWMMWY**

201	211	221
WGPNLYNILS	**PFIPLLPIFF**	**CLWVYI**

[0017] SEQ ID NO: 2 é uma Proteína de Meio da Sequência de Aminoácidos de HBsAG:

1	11	21	31
MQWNSTAFHQ	**ALQHPRVRGL**	**YFPAGGSSSG**	**TVNPAQNIAS**
41	51	61	71
HISSISSRTG	**DPAPNMENIT**	**SGFLGPLLVL**	**QAGFFLLTRI**
81	91	101	111
LTIPQSLDSW	**WTSLNFLGGS**	**PVCLGQNSQS**	**PTSNHSPTSC**
121	131	141	151
PPICPGYRWM	**CLRRFIIFLF**	**ILLLCLIFLL**	**VLLDYQGMLP**
161	**171**	**181**	191
VCPLIPGSTT	**TSTGPCKTCT**	**TPAQGNSMFP**	**SCCCTKPTDG**
201	**211**	**221**	231
NCTCIPIPSS	**WAFAKYLWEW**	**GSVRFSWLSL**	**LVPFVQWFVG**
241	**251**	**261**	271
LSPTVWLSVI	**WMMWYWGPNL**	**YNILSPFIPL**	**LPIFFCLWVY**
281			
I			

[0018] A SEQ ID NO: 3 é uma Proteína Grande da Sequência de Aminoácidos de HBsAG:

MGLSWTVPLE WGKNQSTSNP LGFFPDHQLD PAFGANSNNP DWDLNSNKDH
WPQANQVGVG AFGPGFTPPH GGLLGWSSQA QGTLHTVPAV PPPASTNRQT
KRQPTPISPP LRDSHPQAMQ WNSTAFHQAL QHPRVRGLYF PAGGSSSGTV
NPAQNIASHI SSISSRTGDP APNMENITSG FLGPLLVLQA GFFLLTRILT
IPQSLDSWWT SLNFLGGSPV CLGQNSQSPT SNHSPTSCPP ICPGYRWMCL
RRFIIFLFIL LLCLIFLLVL LDYQGMLPVC PLIPGSTTTS TGPCKTCTTP
AQGNSMFPSC CCTKPTDGNC TCIPIPSSWA FAKYLWEWGS VRFSWLSLLV
PFVQWFVGLS PTVWLSVIWM MWYWGPNLYN ILSPFIPLLP IFFCLWVYI.

Descrição Detalhada das Modalidades

[0019] Os inventores do presente pedido fizeram uma vacina terapêutica melhorada contra hepatite B que é eficaz na indução de uma resposta imunológica de células Th1.

[0020] O vírus da hepatite B é um membro do gênero *Orthohepadnavirus*, da família de vírus *Hepadnaviridae*. É um pequeno vírus de DNA com envelope que compreende um nucleocapsídeo e um envelope externo do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg). O antígeno HBsAg é composto por três proteínas de envelope relacionadas que são todas codificadas pela mesma fase de leitura aberta no DNA viral (a "ORF de S"). Essas três proteínas têm o mesmo terminal C, mas diferem em seus terminais N devido à presença de três códons de início ATG na fase que dividem a ORF de S em três regiões. A proteína de envelope S ou "pequena" é a mais abundante e a menor, com 226 aminoácidos. A proteína de superfície M ou "intermediária" inclui a proteína S e tem um domínio de proteína extra que consiste em 55 aminoácidos conhecidos como pré-S2. A proteína conhecida como proteína L ou "grande" consiste em S, Pré-S2 e um terceiro domínio de proteína é conhecido como pré-S1 que tem 118 aminoácidos. O genoma viral da hepatite B é propenso a erros de replicação, resultando na existência de muitos genótipos e variantes genéticas. Foram identificados pelo menos dez genótipos diferentes do vírus, juntamente com muitas mutações, algumas das quais ocorrem nos domínios de S e Pré-S. Portanto, existem muitas variações de sequência para cada um dos três domínios de proteína.

[0021] Em algumas modalidades, uma proteína S descrita nesse documento compreende ou consiste na sequência de

aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, uma proteína S descrita nesse documento compreende ou consiste em uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, uma proteína Pré-S2 descrita nesse documento compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Em algumas modalidades, uma proteína Pré-S2 descrita nesse documento compreende ou consiste em uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Em algumas modalidades, uma proteína Pré-S1 descrita nesse documento compreende ou consiste na sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. Em algumas modalidades, uma proteína Pré-S1 descrita nesse documento compreende ou consiste em uma sequência de aminoácidos com pelo menos 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

[0022] Nenhum tratamento eficaz para infecção por hepatite B foi encontrado. A infecção aguda é tratada com repouso na cama. A infecção crônica é usualmente tratada com agentes antivirais, especificamente agentes antivirais baseados em nucleosídeos, tal como tenofovir, lamivudina ou entecavir ou com interferon alfa peguilado (IFNα PEG). Os agentes antivirais podem retardar a progressão da cirrose e reduzir a incidência de câncer de fígado, mas provaram ser incapazes de eliminar o vírus do paciente. Além disso, eles são caros e devem ser mantidos por toda a vida do paciente para manter a eficácia. O IFNα PEG está associado a efeitos

colaterais e leva a uma resposta antiviral sustentada em apenas cerca de 30% dos pacientes. Consequentemente, os tratamentos medicinais para a hepatite B crônica geralmente são eficazes apenas para retardar o progresso da doença e não têm tido sucesso como cura. Para eliminar o vírus da hepatite B e, assim, evitar uma condição crônica, o paciente deve gerar uma resposta imunológica potente e diversa. Em particular, uma resposta forte e específica das células T é essencial para alcançar a eliminação viral da hepatite B (Bertoletti e Rivino (2014) Curr Opin Infect. Dis 27:528-534). Esse tipo de resposta é visto quase exclusivamente em pacientes adultos com sistemas imunológicos maduros (Bertoletti e Gehring, (2013) PLOS Path. 9:1-4).

[0023] Dado o impacto significativo da infecção por Hepatite B na saúde, muita atenção foi dada à prevenção da doença. As vacinas profiláticas contra a hepatite B estão disponíveis há mais de 30 anos e, em muitos países, a vacinação universal contra a hepatite B é realizada em crianças. As primeiras vacinas profiláticas contra a hepatite B foram desenvolvidas no final dos anos 1970 usando plasma de pacientes com hepatite B. As vacinas de hepatite B melhoradas tornaram-se disponíveis na década de 1980 e foram produzidas em células de levedura usando tecnologia de DNA recombinante para expressar o domínio de S de HBsAg. Essas vacinas mais modernas suplantaram rapidamente as primeiras vacinas e ainda são as principais vacinas comerciais no mercado hoje. Uma vacina mais avançada contra a hepatite B foi desenvolvida na década de 1990, que é produzida em células de mamíferos e contém todos os três domínios do HBsAg, especificamente S, Pré-S1 e Pré-S2. A

presença dos domínios de Pré-S1 e Pré-S2 foi associada a uma resposta imunogênica aumentada e, também, à inibição da ligação viral e infecciosidade (US 5.242.812). A função biológica das várias proteínas do envelope e a natureza da resposta imunológica a cada um dos componentes (S, pré-S2 e pré-S1) são apenas parcialmente compreendidas. No entanto, sabe-se que, na infecção aguda por hepatite B, os antígenos e anticorpos Pré-S1 e pré-S2 aparecem e desaparecem logo após a infecção aguda, e que os anticorpos para o domínio de S aparecem várias semanas depois. Isso, bem como estudos usando os antígenos de domínio de Pré-S1 ou Pré-S2, sugeriram que os antígenos pré-S1 e pré-S2 podem estar implicados na indução de células T ajudam a produção de anticorpos contra o domínio de S (Milich et al (1985) PNAS 82 8170-8172; Milich et al (1986) J Immunol 137 315-322).

[0024] As vacinas profiláticas contra hepatite B comercialmente disponíveis provaram induzir com sucesso uma forte resposta de anticorpos contra o domínio da proteína S do HBsAG em indivíduos saudáveis, particularmente aqueles que são jovens e não têm comprometimento de seu sistema imunológico. No entanto, as tentativas de usar essas vacinas como tratamentos terapêuticos em pacientes com hepatite B crônica não tiveram sucesso. Os ensaios clínicos conduzidos para medir o efeito terapêutico das vacinas da hepatite B contendo o domínio de S de HBsAG sozinho e os domínios de Pré-S2 e S juntos mostraram que as vacinas não conseguiram eliminar o vírus da hepatite B (Pol et al, (2001) J. Hepatol 34:917-921). A falha do tratamento imunogênico para tratar a infecção crônica por hepatite B é geralmente atribuída à "tolerância imunológica", um fenômeno pelo qual o sistema

imunológico de um paciente com hepatite B deixa de responder à exposição adicional aos antígenos da hepatite B, particularmente o HBsAg. A tolerância imunológica em pacientes com hepatite B crônica tem sido associada à grande produção do vírus de antígenos da hepatite B, que causa exaustão de células T, especificamente células T CD8+ específicas da hepatite B (Boni, C. et al, (2007)J. Virol. 81:4215-4225). As células T específicas da hepatite B exauridas hiperexpressam a proteína 1 de morte celular programada (PD-1), que promove a morte das células T específicas do antígeno. Em pacientes com altas cargas do vírus da hepatite B, a destruição das células T específicas do antígeno pode levar ao desaparecimento completo dessas células do fígado. O resultado é uma resposta enfraquecida das células T à estimulação por antígenos da hepatite B.

[0025] Além do desafio apresentado pela tolerância imunológica, as vacinas contra hepatite B contendo apenas a proteína S de HBsAg podem falhar na eliminação do vírus de pacientes crônicos devido à sua fraca capacidade de estimular a imunidade celular por uma resposta de células T na maioria dos indivíduos. Em um esforço para estimular mais efetivamente uma resposta de células T, estudos de vacinação terapêutica foram realizados em pacientes com hepatite B crônica usando vacinas de hepatite B que contêm todos os três domínios da proteína Pré-S1, Pré-S2 e S. Esses estudos mostraram uma resposta das células T específicas da hepatite B em alguns pacientes. No entanto, o efeito foi transitório e não levou à eliminação da doença, possivelmente porque a vacina estimulou uma resposta de Th2, mas não estimulou uma resposta de linfócitos T CD8+. (Jung et al, (2002) Vaccine

20: 3598-3612, Kosinka et al (2015) Med. Microbiol. Immunol 204). As células Th2, caracterizadas pela secreção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, promovem a produção de anticorpos e geralmente estão associadas a respostas alérgicas e são menos eficazes contra infecções virais do que as células Th1, caracterizadas pela secreção de IFN-γ. Outras tentativas de induzir uma resposta imunológica bem-sucedida usando vacinas de DNA também não conseguiram uma resposta sustentada (Bertoletti e Gehring (2009) Exp. Rev, Gastro. Hep. 3: 561-569).

[0026] Muitos pesquisadores concluíram que uma cura completa para a Hepatite B está a muitos anos de distância e que, usando uma combinação de terapias, pode ser possível alcançar o que foi denominado de "cura funcional", em que pacientes crônicos alcançam redução sustentada no vírus da hepatite B e outros marcadores de doença e uma redução na incidência de câncer de fígado após a interrupção do tratamento (Lok et al, (2017) J. Hep. 67:847-861). Devido ao fracasso dos tratamentos antivirais e vacinas profiláticas por si só em alcançar uma cura funcional, alguns pesquisadores concluíram que pode ser necessário combinar vacinas profiláticas com tratamentos contra hepatite B que reduzem a carga viral. A redução da carga viral pode reduzir o nível de tolerância imunológica e, assim, melhorar a capacidade do tratamento com vacina de induzir uma resposta imunológica capaz de controlar a infecção (Zoulim, F. et al (2018) Cold Spring Harb. Perspect. Med. (2015): 5: a21501). Por exemplo, combinações de vacinas profiláticas com inibidores de nucleosídeos foram tentadas. No entanto, até o momento, as terapias combinadas usando vacinas contra

hepatite B comercialmente disponíveis não tiveram sucesso em alcançar a eliminação viral de pacientes com hepatite B crônica (Vandepapeliere et al (2007) Vaccine 51: 8585-8597). Em um estudo vietnamita, uma tentativa de melhorar a capacidade de resposta foi feita combinando uma vacina mais recente, Genhevac B (uma vacina de proteína Pré-S1, Pré-S2 e S com adjuvante de hidróxido de alumínio), com um inibidor de nucleosídeo (lamivudina). Essa combinação foi superior às terapias individuais sozinhas na redução dos níveis de DNA viral em pacientes. No entanto, o efeito não foi sustentado depois que os tratamentos com a vacina foram interrompidos. Consequentemente, esse tratamento combinado falhou em recrutar o sistema imunológico dos pacientes para eliminar efetivamente o vírus (Hoa, (2009) Antimicrob. Agents e Chemo. 53: 5134-5140).

[0027] Tratamentos combinados triplos mais complexos foram propostos que incluem um anticorpo que bloqueia a atividade de PD-1 junto com um inibidor de nucleosídeo e uma vacina profilática contra hepatite B. Um estudo dessa combinação tripla em um modelo de marmota usando um vírus similar à hepatite B foi eficaz em apenas um terço dos animais (Kosinka et al, (2015) supra: 103-114; Liu et al, Virologica, (2014) 29: 10-16). Além disso, a eficácia dessa combinação tripla não foi demonstrada em humanos, e envolve o uso de tratamentos caros, possivelmente indefinidamente. Assim, o uso de vacinas profiláticas convencionais para fins terapêuticos, mesmo em combinação com outros fármacos, não se mostrou eficaz como cura funcional para Hepatite B em pacientes crônicos. Portanto, para atingir uma resposta sustentada em pacientes com hepatite B crônica, meios

melhorados devem ser encontrados para potencializar a capacidade desses pacientes de montar uma resposta de células T contra o vírus.

[0028] Novas estratégias para o tratamento da hepatite B crônica surgiram, as quais utilizam abordagens de silenciamento de genes. Exemplos desses tratamentos incluem o uso de pequenos RNA interferentes (SiRNA) para interferir na expressão do gene viral, em particular HBsAg. Como os inibidores de nucleosídeos, essas terapias têm o potencial de reduzir a carga viral e os níveis de HBsAg secretado (Woodell et al, (2015) Mol. Ther. 21: 973–985) e foi sugerido que podem ser úteis em combinação com tratamentos que induzem uma resposta imunológica (Ren et al. (2013) PLOSone 8(3):e57525). No entanto, a eficácia dessa combinação não foi estabelecida e, dado o fracasso de estudos anteriores com agentes antivirais, a eficácia pode depender da combinação, incluindo um agente imunológico que é capaz de estimular uma resposta robusta de células Th1.

[0029] Tentativas anteriores foram feitas para potencializar a resposta das células T às vacinas contra hepatite B, alterando as formulações das vacinas. As vacinas contra hepatite B mais comercialmente disponíveis, incluindo a vacina contra hepatite B amplamente usada, Engerix B®, e a vacina contra hepatite B contendo S/Pré-S1 e Pré-S2, Sci-B-Vac,® são formuladas com adjuvante de hidróxido de alumínio. O adjuvante de hidróxido de alumínio é um de uma família de adjuvantes contendo alumínio que às vezes são chamados informalmente de “alúmen” (embora a palavra “alúmen” seja mais corretamente usada para descrever o sulfato de alumínio e potássio hidratado ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12\ H_2O$)

que foi usado como um adjuvante inicial para o toxóide diftérico, mas abandonado devido a dificuldades de fabricação). Adjuvantes à base de alumínio têm sido usados em vacinas humanas desde 1932 e, embora tenham um longo histórico de segurança, seu modo de ação não é totalmente compreendido. Em geral, acredita-se que os adjuvantes à base de alumínio potencializam a resposta imunológica pela ativação de células dendríticas.

[0030] Estudos foram conduzidos para melhor compreender e potencializar a eficácia dos adjuvantes à base de alumínio. Os dois adjuvantes à base de alumínio usados com mais frequência são chamados de "fosfato de alumínio" e "hidróxido de alumínio", com o adjuvante de hidróxido de alumínio sendo o mais amplamente usado comercialmente. O adjuvante de hidróxido de alumínio não é $Al(OH)_3$, mas sim oxi-hidróxido de alumínio cristalino (AlOOH), que tem uma área superficial maior do que o hidróxido de alumínio cristalino. O adjuvante de fosfato de alumínio é na verdade hidroxifosfato de alumínio amorfo ($Al(OH)_x(PO_4)_y$), em que alguns dos grupos hidroxila do adjuvante de hidróxido de alumínio são substituídos por grupos fosfato. A superfície do adjuvante de fosfato de alumínio é composta por grupos Al-OH e Al-OPO_3. Embora sejam quimicamente similares, os dois adjuvantes têm propriedades químicas diferentes. O adjuvante de hidróxido de alumínio tem estrutura cristalina, uma grande área superficial e uma carga positiva em pH neutro (+30 mVolts). O adjuvante de fosfato de alumínio é amorfo e tem carga negativa em pH neutro (aprox. -20 mVolts). Além disso, foi demonstrado que o adjuvante de fosfato de alumínio se dissolve mais rapidamente após a injeção.

[0031] Os antígenos "adsorvem" em adjuvantes à base de alumínio, o que significa que eles aderem ao adjuvante formando uma camada na superfície. Os antígenos são adsorvidos na superfície de adjuvantes à base de alumínio por meio de interação eletrostática, forças de van der Waals e troca de ligando (principalmente fosfato). A troca de ligando é a força de adsorção mais forte e pode ocorrer mesmo quando uma força repulsiva eletrostática está presente. O HBsAg é amplamente composto por fosfolipídios que contêm grupos fosfato que se adsorvem fortemente à superfície mineral hidroxilada do adjuvante por troca de ligando entre os grupos fosfato no antígeno e as hidroxilas de superfície no adjuvante à base de alumínio. A atração eletrostática não é a força de adsorção predominante para HBsAg (Iver et al, (2004) Vaccine, 22:1475-1479).

[0032] Tradicionalmente, a adsorção de antígeno a adjuvantes à base de alumínio foi intencionalmente maximizada porque a adsorção foi geralmente considerada importante para o efeito imunoestimulador devido à retenção do antígeno no local da injeção, criando um efeito de "depot" com liberação prolongada dos antígenos para o sistema imunológico. Além disso, a adsorção completa do antígeno leva a uma maior estabilidade de longo prazo da formulação da vacina durante o armazenamento de longo prazo. Engerix B® contém 10 µg de HBsAg por 250 µg de alumínio do adjuvante de hidróxido de alumínio. Essa razão, 0,04 µg de HBsAg /µg de alumínio, garante a adsorção completa. No entanto, mais recentemente, a relação entre o anticorpo e a imunidade, a eficácia e a adsorção das células T tornou-se menos clara. Estudos sobre o efeito da rigidez da ligação de HBsAg a

hidróxido de alumínio na produção de anticorpos em camundongos imunizados indicaram que as formulações de vacinas com a adsorção mais forte do antígeno no adjuvante produziram a resposta de anticorpos menor. (Clapp et al (2011) J. Pharm Sci 100(2) 388-401). Um estudo usando o domínio de S do antígeno HBsAg mostrou que os adjuvantes à base de alumínio tendo um teor de fosfato maior apresentam adsorção diminuída, ligação ao antígeno mais fraca e maior resposta do anticorpo (Egan et al, (2009) Vaccine 27: 3175-3180). De modo similar, uma vacina de antígeno único contra hepatite B contendo adjuvante de fosfato de alumínio provocou uma maior resposta de anticorpos do que uma vacina similar formulada com adjuvante de hidróxido de alumínio e foi eficaz em uma concentração de adjuvante inferior (Fazeli et al, (2008) DARU 3: 143-148). Pelo menos um estudo mostrou que a adsorção do antígeno por um adjuvante à base de alumínio não é necessária para que o adjuvante potencialize a resposta do anticorpo, levando à conclusão de que a inflamação e não a adsorção está relacionada à imunogenicidade (Noe et al, (2010) Vaccine 28: 3588-3594). Pouco se sabe sobre a extensão em que as composições e quantidades de alumínio alteradas impactam a imunidade das células T Th2 vs. Th1, embora estudos relatando respostas de anticorpos mais elevadas seriam assumidos pelos habilitados na técnica como tendo promovido respostas de Th2 potencializadas, mas não Th1.

[0033] Embora os adjuvantes à base de alumínio sejam bem conhecidos por melhorar a imunogenicidade, também é bem conhecido que eles atuam principalmente para potencializar a produção de anticorpos e, portanto, são mais eficazes no direcionamento de patógenos mortos ou inibidos por meio de

interações com anticorpos. Eles são geralmente considerados ineficazes para provocar uma resposta de Th1 e, em vez disso, provocar uma resposta inflamatória, de Th2, melhorando a atração e a captação de antígeno pelas células apresentadoras de antígeno (APCs). Portanto, adjuvantes à base de alumínio não têm sido empregados na busca por melhores estimulantes da imunidade das células Th1.

[0034] A fim de melhorar a resposta imunológica celular, ou "inata", adjuvantes mais modernos foram adicionados às vacinas contra hepatite B. Um desses adjuvantes modernos é a endotoxina, monofosforil lipídeo A (MPL), um lipossacarídeo bacteriano. WO 93/19780, descreve a estimulação de respostas de células T por vacinas de HBsAg com uma combinação de adjuvantes. Nenhuma resposta de células T (como medido por IL-2, IFN-γ e IL-4) foi observada em camundongos Balb/c após imunização com HBsAg absorvido em hidróxido de alumínio. No entanto, quando monofosforil Lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) foi adicionado à formulação, foi observada uma resposta de células Th1 (como medido por IL-2 e IFN-γ). Uma patente subsequentemente depositada pelo mesmo grupo de pesquisa, US 5.972.346, revelou imunogenicidade humoral melhorada quando fosfato de alumínio foi usado em vez de hidróxido de alumínio em uma formulação de vacina de HBsAg/3D MPL. Essa verificação levou ao desenvolvimento de uma vacina comercial vendida sob a marca Fendrix®. Estudos subsequentes mostraram que Fendrix provoca uma resposta imunológica celular Th1. No entanto, Fendrix é um produto caro e só foi aprovado para uso na Europa em pacientes com mais de 15 anos de idade que sofrem de deficiência renal. Além disso, em outros estudos, os

efeitos do adjuvante de 3D-MPL mostraram ser de curta duração e principalmente limitados ao local da injeção e aos linfonodos regionais (De Pasquale et al., Vaccine 2015).

[0035] Mais recentemente, US 20160136264 divulgou uma vacina contra hepatite B que consiste em fragmentos de antígeno da hepatite B e um adjuvante que consiste em sequências de DNA imunomoduladoras que incluem motivos CpG que foram capazes de mediar uma resposta de Th1 em camundongos. No entanto, foram levantadas questões de segurança sobre o uso de adjuvantes à base de CpG em vacinas contra hepatite B e a autorização de comercialização não foi obtida em todas as jurisdições.

[0036] Verificou-se no presente pedido que uma composição imunogênica compreendendo todas as três proteínas de HBsAg (S, Pré-S1 e Pré-S2) e um adjuvante de fosfato de alumínio é eficaz na estimulação de uma resposta de células Th1 em um mamífero quando a composição tem uma quantidade significativa de antígeno não ligado. A análise físico-química das composições da revelação mostra que o adjuvante está fracamente ligado aos antígenos HBsAg. Como demonstrado nos exemplos nesse documento, essa ligação é significativamente mais fraca do que a observada em vacinas contra hepatite B formuladas com adjuvante de hidróxido de alumínio. Também é significativamente mais fraco do que o observado em formulações compreendendo antígeno HBsAg e adjuvante de fosfato de alumínio tendo uma razão menor de antígeno HBsAg para adjuvante de fosfato de alumínio.

[0037] Surpreendentemente, as composições da revelação induziram uma resposta de células Th1 potencializada em um mamífero sem a presença de outro adjuvante, mais moderno,

que é conhecido por estimular a imunidade celular, tal como MPL ou CpG. Essas respostas de células Th1 foram demonstradas experimentalmente usando diferentes marcadores imunológicos, especificamente respostas de IFN-γ específicas de antígeno e razões de IgG2a/IgG1. Isso é surpreendente tendo em vista os estudos anteriores que não mostraram nenhuma resposta de Th1 às vacinas convencionais da Hepatite B formuladas apenas com adjuvantes à base de alumínio.

[0038] Ainda mais surpreendente, as composições imunogênicas da revelação são eficazes em potencializar as respostas das células Th1 quando uma concentração significativamente reduzida de adjuvante de fosfato de alumínio foi usada em relação à quantidade de antígeno na composição, em comparação com uma vacina profilática disponível comercialmente. Em particular, as composições da revelação são eficazes no aumento das respostas de Th1 com uma razão 50% inferior de adjuvante de fosfato de alumínio para antígeno em comparação com a vacina profilática comercialmente disponível mais amplamente usada.

[0039] As vacinas da revelação compreendem HBsAg que inclui todas as três proteínas S, Pré-S1 e Pré-S2. O HBsAg pode se originar de qualquer genótipo, cepa ou isolado de Hepatite B. Além disso, o HBsAg pode se originar de um HBsAg nativo ou de um HBsAg modificado. O antígeno HBsAg pode ser isolado de uma fonte natural do vírus da hepatite B, tais como amostras biológicas (por exemplo, sangue, plasma, soro, sêmen, saliva, seções de tecido, amostra de biópsia, etc.) coletadas de um indivíduo infectado, células cultivadas ou culturas de tecidos. O HBsAg também pode ser produzido usando técnicas recombinantes em células. Em algumas modalidades,

o HBsAg é expressado em uma linha de células de mamíferos. Em algumas modalidades, o HBsAg é expressado em linhas de células de ovário de hamster chinês. O antígeno HBsAg compreendendo os domínios de S, Pré-S1 e Pré-S2 pode ser produzido usando o método revelado em US 5.242.812. As sequências de nucleotídeos que codificam diferentes HBsAg podem ser encontradas em bancos de dados como Banco de Genes e na literatura publicada (por exemplo Fukimori et al (1990) 18 Nuc. Acid Res 4587; Vaudin et al (1988) 69 J. Gen Virol. 1383-1389). Uma sequência de aminoácidos para a grande proteína de HBsAg é mostrada na SEQ ID NO. 1. Em uma modalidade preferida, as composições imunogênicas da revelação compreendem 20 μg/ml ou mais de antígeno HBsAg tendo todas as três proteínas S, Pré-S1 e Pré-S2. Em outra modalidade preferida, a composição imunogênica da revelação compreende 20 μg/ml-60μg/ml de antígeno HBsAg com todas as três proteínas S, Pré-S1 e Pré-S2.

[0040] As formulações de vacina da presente revelação compreendem adicionalmente adjuvante de fosfato de alumínio. Um exemplo de um adjuvante de fosfato de alumínio adequado para uso na presente revelação é Adju-Phos®, uma suspensão de gel úmido de fosfato de alumínio fabricada por Brenntag.

[0041] Como mostrado no Exemplo 2, formulações de vacina de HBsAg usando adjuvante de hidróxido de alumínio (incluindo a formulação profilática comercialmente disponível da vacina contendo todos os três antígenos de S, Pré-S1 e Pré-S2, vendidos em associação com a marca comercial Sci-B-Vac) contém menos de 5% de antígeno não adsorvido. Como mostrado na Tabela 3, uma formulação contendo a mesma quantidade de antígeno usada na vacina profilática, 10 μg/ml de antígeno

HBsAg tendo todos os três domínios de S, Pré-S1 e Pré-2, com adjuvante de fosfato de alumínio em vez de o hidróxido de alumínio não apresentou uma quantidade aumentada de antígeno não adsorvido e, de fato, como mostrado na Tabela 3, não havia antígeno não absorvido nessa formulação. Isso foi surpreendente porque o adjuvante de fosfato de alumínio é conhecido por se ligar mais fracamente ao antígeno HBsAg do que o adjuvante de hidróxido de alumínio. No entanto, a uma concentração de antígeno de 10 μg/ml de HBsAg, níveis similares de adsorção foram observados usando o adjuvante de fosfato de alumínio e o adjuvante de hidróxido de alumínio.

[0042] No entanto, surpreendentemente, uma formulação tendo uma concentração aumentada de antígeno HBsAg (compreendendo proteínas S, Pré-S1 e Pré-S2) e a mesma concentração de adjuvante de fosfato de alumínio demonstrou um teor substancialmente aumentado de antígeno não adsorvido. Um teor de alumínio de 500 μg/ml de adjuvante de fosfato de alumínio é equivalente a 2,27 mg/ml de adjuvante de fosfato de alumínio. A uma concentração de HBsAg de 20 μg/ml e 500 μg/ml de alumínio presente como adjuvante de fosfato de alumínio, a quantidade de antígeno não adsorvido foi de 54,8%. A uma concentração de HBsAg de 40 μg/ml e 500 μg/ml de alumínio como adjuvante de fosfato de alumínio, a quantidade de antígeno não adsorvido foi de 35,8%. A uma concentração de HBsAg de 60 μg/ml e 500 μg/ml de alumínio como adjuvante de fosfato de alumínio, a quantidade de antígeno não adsorvido foi de 47,4%. A adsorção de antígeno reduzida não foi observada em formulações contendo a mesma concentração de antígeno HBsAg com hidróxido de alumínio adjuvante. De fato, quando o adjuvante de hidróxido de

alumínio foi usado, a quantidade de antígeno não adsorvido permaneceu abaixo de 5%, mesmo quando a concentração de antígeno foi dobrada para 20 μg/ml (ver Tabela 3). Consequentemente, o uso de adjuvante de fosfato de alumínio, com uma concentração aumentada de HBsAg, resultou em um aumento significativo e surpreendente no antígeno não adsorvido.

[0043] Por conseguinte, em uma modalidade preferida da revelação, a composição imunogênica compreende entre 62,5 e 500 μg/ml de alumínio como adjuvante de fosfato de alumínio. Em uma modalidade particularmente preferida, a composição imunogênica da revelação compreende 500 μg/ml de alumínio como adjuvante de fosfato de alumínio e 20 μg/ml–60 μg/ml de antígeno HBsAg tendo todos os três de proteínas S, Pré–S1 e pré–S2. Em uma modalidade particularmente preferida, a composição imunogênica da revelação compreende 500 μg/ml de alumínio como adjuvante de fosfato de alumínio e 20 μg/ml de antígeno HBsAg tendo todas as três proteínas S, Pré–S1 e Pré–S2.

[0044] Usando estudos *in vivo* em camundongos, os inventores da presente revelação demonstraram que as composições imunogênicas da revelação são eficazes na potencialização de uma resposta de Th1 em camundongos. Esse efeito é inesperado porque uma resposta de Th1 potencializada não foi observada em composições de HBsAg em que o adjuvante de hidróxido de alumínio foi usado, mesmo quando a concentração de antígeno foi significativamente aumentada. Especificamente, como mostrado no Exemplo 3, uma concentração maior de 20 μg/ml de antígeno HBsAg (compreendendo proteínas S, Pré–S1 e Pré–S2) com 500 μg/ml

de alumínio como adjuvante de hidróxido de alumínio não potencializou a imunidade de célula T Th1 em camundongos em comparação com a vacina profilática comercialmente disponível (que tem 10 μg/ml do mesmo antígeno e 500 μg/ml de alumínio como adjuvante de hidróxido de alumínio). No entanto, como descrito nos Exemplos 4 e 5, uma composição imunogênica preferida da revelação tendo 20 μg de antígeno formulado com 500 μg/ml de alumínio a partir de adjuvante de fosfato de alumínio provocou uma resposta de células Th1 significativamente maior quando comparada cabeça a cabeça com a formulação profilática da vacina (que tem 10 μg/ml do mesmo antígeno e 500 μg/ml de alumínio do adjuvante hidróxido de alumínio). Além disso, como descrito no Exemplo 6, as composições imunogênicas da revelação tendo 20 μg, 40 μg e 60 μg de antígeno formulado com 500 μg/ml de alumínio a partir de adjuvante de fosfato de alumínio provocaram todas uma resposta de célula Th1 superior quando comparada cabeça à cabeça com a formulação profilática da vacina (que contém 10 μg/ml do mesmo antígeno e 500 μg/ml de alumínio do adjuvante hidróxido de alumínio). Esses resultados indicam que simplesmente alterar a razão de adjuvante:antígeno na composição imunogênica preferida da revelação não foi suficiente para potencializar a imunidade das células T Th1. Em vez disso, a alteração da concentração de antígeno e do tipo de adjuvante (adjuvante de fosfato de alumínio em vez de adjuvante de hidróxido de alumínio) foi necessária para potencializar a imunidade das células T Th1. A imunidade Th1 potencializada foi observada apenas nas composições tendo uma quantidade aumentada de antígeno não adsorvido.

[0045] A presente revelação também fornece o uso de uma

composição imunogênica da revelação para a preparação de uma composição farmacêutica para induzir ou potencializar uma resposta imunológica de células Th1 contra infecção por Hepatite B em um paciente. A presente revelação fornece adicionalmente o uso de uma composição imunogênica da revelação para a preparação de um fármaco para o tratamento da infecção por Hepatite B, particularmente infecção por Hepatite B crônica, em um paciente.

[0046] A presente revelação também fornece composições farmacêuticas que são úteis em aplicações terapêuticas em indivíduos que sofrem de infecção crônica por hepatite B.

[0047] Em certas modalidades, as composições farmacêuticas fornecidas podem ser formuladas para dispensação parenteral, por exemplo, por injeção. Em tais modalidades, a formulação pode ser adequada para injeção intramuscular.

[0048] Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas são fornecidas em uma forma de dosagem líquida adequada para injeção. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas são fornecidas como pós (*por exemplo*, liofilizadas e/ou esterilizadas), opcionalmente sob vácuo, que são reconstituídos com um diluente aquoso (por exemplo, água, tampão, solução salina, etc.) antes da injeção. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas são diluídas e/ou reconstituídas em água, géis, solução de cloreto de sódio, solução de acetato de sódio, solução de álcool benzílico, solução salina tamponada com fosfato, etc. Em algumas modalidades, o pó deve ser misturado suavemente com o diluente aquoso (por exemplo, não agitado).

[0049] Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas fornecidas compreendem um ou mais de excipientes farmaceuticamente aceitáveis (por exemplo, conservante, diluente inerte, agente dispersante, agente tensoativo e/ou emulsificante, agente tamponante, etc.). Os excipientes adequados incluem, por exemplo, água, solução salina, dextrose, sacarose, trealose, glicerol, etanol ou similares e combinações dos mesmos. Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21ª Edição, A. R. Gennaro, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006) revela vários excipientes usados na formulação de composições farmacêuticas e técnicas conhecidas para a preparação das mesmas. Exceto na medida em que qualquer meio excipiente convencional seja incompatível com uma substância ou seus derivados, tal como ao produzir qualquer efeito biológico indesejável ou de outra forma interagir de forma deletéria com qualquer(quaisquer) outro(s) componente(s) da composição farmacêutica, seu uso é contemplado dentro do escopo dessa revelação. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas compreendem um ou mais conservante(s). Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas não compreendem conservante.

[0050] Uma composição farmacêutica de acordo com a revelação pode ser preparada, acondicionada e/ou vendida a granel, como uma dose unitária única e/ou como uma pluralidade de doses unitárias únicas. Conforme usado nesse documento, uma "dose unitária" é uma quantidade discreta da composição farmacêutica que compreende uma quantidade predeterminada do ingrediente ativo. A quantidade do ingrediente ativo é geralmente igual a uma dose que seria

administrada a um indivíduo e/ou uma fração conveniente de tal dose tal como, por exemplo, metade ou um terço de tal dose.

[0051] As composições farmacêuticas descritas nesse documento serão geralmente administradas em tais quantidades e pelo tempo que for necessário ou suficiente para induzir ou potencializar uma resposta imunológica Th1 em um indivíduo. Os regimes de dosagem podem consistir em uma única dose ou uma pluralidade de doses ao longo de um período de tempo. A quantidade exata de uma composição a ser administrada pode variar de indivíduo para indivíduo e pode depender de vários fatores. Assim, será apreciado que, em geral, a dose precisa usada será como determinado pelo médico prescritor e dependerá não apenas do peso do indivíduo e da via de administração, mas também da idade do indivíduo e da gravidade dos sintomas. Em certas modalidades, uma determinada quantidade da composição da vacina é administrada como uma dose única. Em certas modalidades, uma determinada quantidade da composição é administrada como mais de uma dose.

[0052] A presente revelação também fornece um método para induzir ou potencializar uma resposta imunológica de células T contra a infecção por Hepatite B em um mamífero, compreendendo a administração ao mamífero de uma composição da revelação. A resposta imunológica é, de preferência, uma resposta de Th1 direcionada a um antígeno da hepatite B. A administração pode ser realizada por injeção por qualquer meio, por exemplo, por injeção intramuscular. As injeções podem ser feitas com seringas e agulhas convencionais, ou quaisquer outros dispositivos apropriados disponíveis na

técnica.

[0053] A presente revelação também fornece um método de tratamento da infecção por hepatite B, particularmente infecção por hepatite B crônica, em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição da revelação. A administração pode ser realizada por injeção por qualquer meio, por exemplo, por injeção intramuscular. As injeções podem ser feitas com seringas e agulhas convencionais, ou quaisquer outros dispositivos apropriados disponíveis na técnica.

[0054] Se desejado, um método ou uso da revelação pode ser realizado em combinação com um ou mais de tratamentos terapêuticos convencionais para infecção por hepatite B e/ou doença mediada por hepatite B. A administração de uma composição da revelação pode preceder a, ser concomitante com a, ou subsequente à, administração da composição da revelação. Os tratamentos terapêuticos que podem ser combinados com as composições da revelação podem ser administrados com a finalidade de reduzir a carga do vírus da Hepatite B antes da, ou concomitante com a, administração da composição imunogênica da revelação. Exemplos representativos de tratamentos de hepatite B que podem ser combinados com as composições da revelação incluem, sem limitação, inibidores de polimerase, inibidores de RNase H, análogos de nucleosídeo, análogos de nucleotídeo, agonistas de TLR, inibidores de N-glicosilação, siRNA, oligonucleotídeos antissentido, anticorpos anti-hepatite B, inibidores da capsídeo, inibidores da proteína do núcleo, moduladores do conjunto do núcleo, redutores ou

sequestradores do antígeno de S, incluindo polímeros de ácido nucleico, inibidores de ccc DNA, interferons e moduladores imunológicos. Embora esse padrão de cuidado possa variar de paciente para paciente, os tratamentos mais comuns para hepatite B incluem nucleotídeos ou análogos de nucleosídeos (tais como lamivudina, entecavir, telbivudina, adefovir, dipivoxil ou tenofovir) com ou sem citocinas (por exemplo, IFNα, IFNα2a peguilado e IFNα2b peguilado). No entanto, os tratamentos mais recentes para reduzir a carga viral da hepatite B e/ou os níveis de HBsAg secretado presentes no plasma ou soro, tal como siRNA ou agentes sequestrantes de antígeno de S (tal como REP-2139, um candidato de fármaco de polímero de ácido nucleico produzido pela Replicor Inc.), podem ser efetivamente combinados com as composições da revelação. Os tratamentos da hepatite B podem ser fornecidos em dose única ou, alternativamente, em doses múltiplas de acordo com protocolos, dosagens e regimes padrão durante várias horas, dias, semanas e/ou meses.

[0055] As composições da revelação também podem incluir um outro adjuvante.

[0056] A invenção foi descrita de uma maneira ilustrativa e muitas modificações e variações da presente invenção são possíveis à luz dos ensinamentos acima. Deve, portanto, ser entendido que dentro do escopo das reivindicações, a invenção pode ser praticada de uma maneira diferente daquela que é especificamente descrita nesse documento.

[0057] Todas as revelações acima citadas de patentes, publicações e entradas de banco de dados são especificamente incorporadas nesse documento por referência em sua totalidade, na mesma medida como se cada patente individual,

publicação ou entrada fosse especificamente e individualmente indicada para ser incorporada por referência.

Exemplos

[0058] Os exemplos a seguir descrevem alguns modos exemplificativos de preparar e praticar certas composições que são descritas nesse documento. Deve ser entendido que esses exemplos são apenas para fins ilustrativos e não se destinam a limitar o escopo das composições e dos métodos descritos nesse documento.

Exemplo 1: Preparação de Formulações de Vacina

[0059] Um antígeno de superfície da hepatite B consistindo em todas as três proteínas S, pré-S1 e pré-S2 foi preparado em células CHO de acordo com o método descrito em US 5.242.812.

[0060] As formulações de vacinas compreendendo o adjuvante de hidróxido de alumínio foram preparadas como a seguir. Resumidamente, duas concentrações diferentes de HBsAg (10 mcg/ml e 20 mcg/ml) usando 500 mcg/ml de teor de alumínio de adjuvante de hidróxido de alumínio (Alhydrogel®) foram agitadas por um tempo de 16 ± 4 horas em temperatura ambiente. Mais especificamente, tampão de sacarose de fosfato e HBsAg foram adicionados a um frasco de vidro estéril e misturados suavemente com uma pipeta. A um frasco de vidro estéril separado, uma pequena barra de agitação foi adicionada seguida por solução salina a 0,9% e adjuvante Alhydrogel enquanto se agitava a 100 ± 50 rpm. Enquanto a solução salina a 0,9% e o Alhydrogel eram agitados, a mistura de PBS e HBsAg foi adicionada lentamente usando uma pipeta de 20-200 µl (ver Tabela 1 abaixo). Uma rolha ou tampa à

prova de vazamento foi adicionada a cada frasco e selada com segurança. O frasco com adjuvante Alhydrogel foi deixado em agitação em temperatura ambiente (15–25 °C) por 16 ± 4 horas a 100 ± 50 rpm. Uma vez que a agitação foi completada, a formulação da vacina foi armazenada a 2–8 °C até a análise ou imunização.

Tabela 1: Composições Imunogênicas com Adjuvante de Hidróxido de Alumínio

	Volumes da Formulação				**Especificações Alvo de Artigo Final de Teste**	
Concentra-ção de HBsAg Final (μg/mL)	**Volume de PBS estéril (μL)**	**Volume de 10μg/ml de HBsAg (μL)**	**Volume de Cloreto de sódio a 0,9% (154mM) (μL)**	**Volume de Alhydrogel a 2% (10 mg/mL de Al+++) (μL)**	Volume Final (μL)	Concentração Final de Alumínio (μg/mL de Al +++)
20	219	181	3400	200	4000	500
10	309	91	3400	200	4000	500

[0061] Formulações de vacinas compreendendo adjuvante de fosfato de alumínio (Adjuphos®) foram preparadas como a seguir. Resumidamente, duas concentrações diferentes de HBsAg (10 μg/ml e 20 mcg/ml) usando 500 μg/ml de alumínio como adjuvante de fosfato de alumínio (Adjuphos) foram giradas a 8–12 rpm por 60 minutos em temperatura ambiente. Mais especificamente, o adjuvante Adjuphos foi adicionado a um recipiente estéril seguido por um tampão de fosfato 10 mM e sacarose a 8%. O HBsAg foi adicionado ao mesmo recipiente e misturado lentamente por pipeta de aspiração (ver Tabela 2 abaixo). O recipiente foi selado e coberto com folha de alumínio e, em seguida, girado por 60 minutos a 8–12 rpm em temperatura ambiente. Uma vez que a agitação foi completada, a formulação da vacina foi armazenada a 2–8 °C até a análise ou imunização.

Tabela 2: Formulações Imunogênicas com Adjuvante de Fosfato de Alumínio

Concentração de HBsAg Final (μg/mL)	**Volume de Tampão de Fosfato 10 mM, Sacarose a 8% (μL)**	**Volume de HBsAg (μL)**	**Volume de AdjuPhos a 2% (5 mg/mL de Al+++) (μL)**	Volume Final (μL)	Concentração Final de Alumínio (μg/mL)
60	0	9000*	3000	30000	500
40	3000	6000*	3000	30000	500
20	3619	181**	200	4000	500
10	3709	91**	200	4000	500

*HBsAg (Concentração = 200 μg/mL; Lote# B-061-6 diluído),
**HBsAg (Concentração = 441 μg/mL; Lote# B-054-3),

Exemplo 2: Avaliação da Adsorção de Antígeno em Adjuvante

[0062] A ligação do antígeno de superfície da hepatite B ao adjuvante de hidróxido de alumínio e ao adjuvante de fosfato de alumínio foi medida como a seguir. Resumidamente, dentro de uma cabine de biossegurança estéril, 500 μL de cada formulação de vacina foram transferidos assepticamente para um tubo de centrífuga de polipropileno estéril, após mistura 10-20 vezes por pipetagem antes da transferência para garantir que a solução fosse homogênea. Todas as alíquotas foram então centrifugadas a 14.000g por 120 minutos. O sobrenadante (450 μl) foi cuidadosamente removido dos tubos centrifugados contendo as formulações imunogênicas usando uma pipeta de 20-200 μL e transferido para novos tubos de centrífuga de polipropileno estéreis. Os tubos centrifugados contendo sedimentos de formulação imunogênica foram recolocados em suspensão pela adição de um volume de tampão igual ao removido (450 μl). Os tubos foram rotulados apropriadamente (sedimentos sobrenadantes vs. recolocados em suspensão de formulações imunogênicas centrifugadas). Os

sedimentos diluídos (contendo HBsAg ligado) e sobrenadantes (contendo HBsAg livre) foram armazenados a 2–8 °C em um refrigerador. A Tabela 3 abaixo demonstra o impacto da concentração do antígeno HBsAg, escolha do adjuvante de alumínio e dose do adjuvante na quantidade de HBsAg não ligado/livre.

Tabela 3: Teor de Antígeno não Adsorvido das Composições de Teste de HBsAg

Artigo Teste	HBsAg Alvo (μg/mL)	Alumínio Alvo μg/mL [Al+++]	Proteína Total (μg/mL)			HBsAg não adsorvido
			Original	Sobrenadante (Livre)	Sedimento (Ligado)	
1	40	62,5 Alhydrogel	31,9	0,8	32,1	2,8%
2	40	125 Alhydrogel	33,2	Não Detectado	35,8	0%
3	40	250 Alhydrogel	41,6	1,1	39,6	2,7%
4	40	500 Alhydrogel	44,8	1,2	47,6	2,5%
5	20	500 Alhydrogel	39,8	Não Detectado	36,6	0%
6	10	500 Alhydrogel	32,5	Não Detectado	34,3	0%
7	40	62,5 Adjuphos	10,2	5,9	4,9	54,6%
8	40	125 Adjuphos	10,1	5,1	4,2	54,8%
9	40	250 Adjuphos	10,5	4,5	5,2	46,4%
10	40	500 Adjuphos	12,2	3,8	6,8	35,8%
11	20	500 Adjuphos	10,0	3,4	2,8	54,8%
12	10	500 Adjuphos	3,5	Não Detectado	3,1	0%
13	60	500 Adjuphos	11,84	7,6	8,43	47,4%

[0063] O artigo de teste 6 (TA6) é a vacina profilática Sci–B–Vac comercialmente disponível e não havia nenhum HBsAg não adsorvido (livre) detectável que pudesse ser detectado no sobrenadante. Alterar a razão de antígeno para adjuvante,

aumentando a concentração de antígeno 4 vezes (TA4), não alterou substancialmente a quantidade de antígeno não adsorvido (2,5%). De modo similar, alterar a razão de antígeno para adjuvante, reduzindo a quantidade de adjuvante de hidróxido de alumínio (Alhydrogel), não aumentou a quantidade de antígeno não adsorvido acima de 5% (TA1-3).

[0064] A alteração do adjuvante usado nas composições imunogênicas de adjuvante de hidróxido de alumínio (Alhydrogel) (TA6) para adjuvante de fosfato de alumínio (Adjuphos) (TA12) falhou similarmente em aumentar a quantidade de HBsAg não adsorvido (0% detectado) quando a concentração de HBsAg fosse mantida a 10 μg/ml. Surpreendentemente, no entanto, aumentar a concentração de antígeno (TA11) 2 vezes e/ou diminuir a concentração de adjuvante de fosfato de alumínio (TA7-10) aumentou substancialmente a quantidade de HBsAg não adsorvido para acima de 30%. Em particular, uma concentração de 20 μg/ml de antígeno demonstrou uma quantidade muito alta de HBsAg não absorvido quando formulado com 500 μg/ml de alumínio de adjuvante de fosfato de alumínio. Essa concentração de adjuvante, especificamente 500 μg/ml, é amplamente usada em vacinas de HBsAg disponíveis comercialmente, embora com adjuvante de hidróxido de alumínio em vez de adjuvante de fosfato de alumínio.

[0065] Em resumo, não há HBsAg não adsorvido na vacina profilática comercialmente disponível conhecida como Sci-B-Vac (TA6), mas mais do que 50% de HBsAg não adsorvido em uma modalidade da revelação tendo 20 μg/ml de HBsAg e 500 μg/ml de alumínio como adjuvante de fosfato de alumínio (TA11). Mudanças no tipo de adjuvante à base de alumínio e na

concentração de antígeno foram necessárias para obter quantidades de antígeno não adsorvido maiores que 30%.

Exemplo 3: Avaliação da Imunidade de Células T Th1 em Camundongos após vacinação com duas Composições Imunogênicas diferentes Compreendendo HBsAg Compreendendo Antígeno de S, Pré-S1 e Pré-S2 e Hidróxido de Alumínio.

[0066] Esse exemplo descreve a avaliação da resposta de células T em camundongos após imunização com duas formulações imunogênicas diferentes compreendendo diferentes concentrações de antígeno (HBsAg compreendendo proteína S, Pré-S1 e Pré-S2) e 500 μg/ml de alumínio a partir de hidróxido de alumínio adjuvante (TA5 e TA6 na Tabela 3). Os camundongos Balb/c foram vacinados 3 vezes na semana 0, 3, 10 (ou 13) com 1/20 das formulações de dose humana da vacina (isto é, 0,5 μg de antígeno de TA6 e 1,0 g de antígeno de TA5). Os camundongos foram sacrificados no dia 6 após a 3ª vacinação para medir as respostas às proteínas S, pré-S1, pré-S2 de HBsAg usando grupamentos de peptídeos sobrepostos por ensaio de imunoabsorção enzimático ("ELISPOT"), como descrito abaixo. Respostas de anticorpos anti-HBsAg comparáveis foram induzidas com as duas formulações (dados não mostrados).

[0067] As análises ELISPOT de IFN-γ para medir as respostas das células T Th1 foram realizadas como a seguir. Os camundongos foram divididos em grupos de 8 camundongos, cada um imunizado com as duas formulações de teste descritas acima, cada um tendo a mesma concentração de adjuvante de hidróxido de alumínio, mas concentrações diferentes de antígeno HBsAg. Quatro camundongos por grupo foram sacrificados e os baços foram removidos. Baços de camundongos

individuais foram processados para produzir suspensões de células únicas. Os eritrócitos foram lisados usando um tampão disponível comercialmente (BioLegend). Os esplenócitos foram então recolocados em suspensão a 6 x 10^6 esplenócitos/mL. Um dia antes da coleta e processamento do baço, as placas ELISPOT foram revestidas com anticorpo de captura de Interferon-gama (IFN-γ). Nenhum peptídeo, mistura de peptídeo de actina, mistura de peptídeo Pré-S1, mistura de peptídeo Pré-S2, mistura de peptídeo HBsAg e forbol 12-miristato 13-acetato e ionomicina (PMA/iono) foram selecionados como estimulantes. No dia da coleta do baço, os estimulantes foram adicionados aos poços da placa ELISPOT designados. 1,5 x 10^5 esplenócitos foram adicionados a poços de PMA/iono e 3 x 10^5 esplenócitos foram adicionados a todos os outros estimulantes. As placas ELISPOT foram então colocadas em uma incubadora úmida de 37 °C com CO_2 a 5% por 40-48 horas. Após a incubação, as placas foram lavadas para remoção de esplenócitos, estimulantes e meios e foi adicionado anticorpo de captura de IFN-γ, seguido de estreptomicina-peroxidase de rábano (strep-HRP). As placas foram finalmente desenvolvidas com substrato de 3-Amino-9-etilcarbazol (AEC) (BD BioSciences) comercialmente disponível. Os pontos observados foram contados usando um leitor de placas ELISPOT e os dados finais foram relatados como células formadoras de pontos (SFC) por um milhão de esplenócitos. A Tabela 4 abaixo apresenta os resultados desse estudo de imunogenicidade.

Tabela 4: Atividade de Th1 medida por ELISPOT

Composição Imunogênico	Pré-S1 (IFN-γ+ SFC/10^6 de esplenócitos)		Pré-S2 (IFN-γ+ SFC/10^6 de esplenócitos)	sAg (IFN-γ+ SFC/10^6 de esplenócitos)		
	GM	SE	GM	SE	GM	SE
Formulação de HBsAg a 10μg contendo 500 μg/mL de **[Al+++]** (Alhydrogel)	6,048	2,549	124,6	38,31	1056	225,9
Formulação de HBsAg a 20μg contendo 500 μg/mL de **[Al+++]** (Alhydrogel)	6,328	2,918	112,3	48,17	1094	214,6

Observação: GM = média geométrica; SE = erro padrão

[0068] A Tabela 4 demonstra que maiores quantidades de antígeno HBsAg em formulações contendo hidróxido de alumínio como adjuvante não mostraram resposta melhorada de células T Th1. Esse resultado é consistente com os dados da Tabela 2, que mostrou que ambas as formulações não tinham antígeno não absorvido.

Exemplo 4: Comparação da Imunidade de Células T em Camundongos após Vacinação com uma Vacina Profilática Disponível Comercialmente Conhecida como Sci-B-Vac (10 μg/ml de HBsAg Compreendendo S, Pré-S1 e Pré-S2 e 500 μg/ml de alumínio como Adjuvante de Hidróxido de Alumínio) e uma formulação da revelação compreendendo 20 μg de HBsAg e 500 μg/ml de alumínio como Adjuvante de Fosfato de Alumínio.

[0069] Esse exemplo descreve a avaliação da resposta de células T em camundongos após vacinação com duas composições imunogênicas diferentes. A primeira composição foi a vacina profilática comercialmente disponível conhecida como Sci-B-Vac que compreende 10 μg/ml de HBsAg compreendendo proteínas

S, Pré-S1 e Pré-S2 e 500 μg/mL de alumínio como adjuvante de fosfato de alumínio (TA6 na Tabela 3). A segunda composição era uma composição imunogênica da revelação compreendendo uma concentração 2 vezes maior do mesmo HBsAg (20 μg/mL) e 500 μg/mL de alumínio como adjuvante de fosfato de alumínio (TA11 na Tabela 3). Os camundongos Balb/c foram vacinados 3 vezes na semana 0, 3, 6 (ou 8) com 1/20 da dose humana de cada composição imunogênica (isto é, 0,5 μg de antígeno de TA6 e 1,0 μg de antígeno de TA11). Os camundongos foram sacrificados no dia 6 após a 3ª vacinação para medir as respostas às proteínas pré-S1, pré-S2 e HBsAg usando grupamentos de peptídeos sobrepostos por ELISPOT como descrito acima. Respostas de anticorpos anti-HBsAg comparáveis foram induzidas com as duas formulações.

Tabela 5: Atividade de Th1 como medida por ELISPOT

Composição Imunogênico	Pré-S1 (IFN-γ+ SFC/10^6 de esplenócitos)		Pré-S2 (IFN-γ+ SFC/10^6 de esplenócitos)		sAg (IFN-γ+ SFC/10^6 de esplenócitos)	
	GM	SE	GM	SE	GM	SE
Formulação de HBsAg a 10μg contendo 500 μg/mL de **[Al+++]** (Alhydrogel)	5,833	0,4951	53,66	7,991	160,3	35,78
Formulação de HBsAg a 20μg contendo 500 μg/mL de **[Al+++]** (Adjuphos)	5,439	0,8325	271,7	62,9	333,0	35,51

[0070] Como pode ser visto na Tabela 5, a composição imunogênica da revelação contendo 20 μg de HBsAg e 500 μg/ml de alumínio como adjuvante de fosfato de alumínio estimula uma resposta de células Th1 substancialmente maior contra os antígenos de Pré-S2 e S do que versão profilática

comercialmente disponível da vacina formulada com uma concentração muito menor do mesmo antígeno (10 μg/ml) e adjuvante de hidróxido de alumínio. Esse resultado é consistente com os dados na Tabela 2, que mostra uma grande porcentagem de antígeno não ligado (54,8%) na composição imunogênica da revelação (TA11), em comparação com nenhum antígeno não ligado na vacina de HBsAg profilática comercialmente disponível (TA6). A resposta parece ter sido maior em relação a Pré-S2. Nenhuma resposta foi detectada contra o antígeno de Pré-S1 com qualquer formulação.

Exemplo 5: Comparação de Razões Individuais de IgG1/IgG2a em Camundongos após vacinação com uma Vacina Profilática Comercialmente Disponível Conhecida como Sci-B-Vac (10 μg/ml de HBsAg Compreendendo S, Pré-S1 e Pré-S2 e 500 μg/ml de alumínio como adjuvante de hidróxido de alumínio) e uma formulação da revelação compreendendo 20 μg de HBsAg e 500 μg/ml de alumínio como adjuvante de fosfato de alumínio.

[0071] Esse exemplo descreve a comparação de razões de IgG1/IgG2a individuais em camundongos após a vacinação com duas composições imunogênicas diferentes. A primeira composição foi a vacina profilática disponível comercialmente conhecida como Sci-B-Vac que compreende 10 μg/ml de HBsAg compreendendo proteínas S, Pré-S1 e Pré-S2 e 500 μg/mL de alumínio como adjuvante de hidróxido de alumínio (TA6 na Tabela 3). A segunda composição era uma composição imunogênica da revelação compreendendo uma concentração 2 vezes maior do mesmo HBsAg (20 μg/mL) e 500 μg/mL de alumínio como adjuvante de fosfato de alumínio (TA11 na Tabela 3). Camundongos Balb/c (n = 8) foram vacinados 3 vezes nas semanas 0, 3, 6 com 1/20 da dose humana de cada composição

imunogênica (isto é, 0,5 μg de antígeno de TA6 e 1,0 μg de antígeno de TA11). Os camundongos foram sacrificados no dia 6 após a 3ª vacinação para medir o IgG1 Anti-HBs e o IgG2 Anti-HB por ELISA como a seguir.

[0072] IgG1 Anti-HBs: placas de 96 poços foram revestidas durante a noite a 4 °C, com proteína de antígeno de superfície de hepatite B recombinante, Abcam (0,25 μg/mL em DPBS). No dia seguinte, as placas foram bloqueadas com soro de cabra a 10% em tampão de lavagem ELISA (Tween-20 a 0,05% em PBS) por 1 hora a 37 °C. As placas foram lavadas com tampão de lavagem, seguido pela adição de diluições de 2 vezes de soros de camundongos individuais; começando em 1:10.000 a 1:1280.000. As placas foram incubadas, por 1,5 horas a 37 °C, seguido por lavagem das placas e adição de anticorpo secundário. Foi adicionado IgG1 anti-camundongo de cabra (Betil), diluído em 1:10.000 em 10% de soro de cabra em tampão de lavagem ELISA e as placas foram incubadas por 1,5 horas a 37 °C. Foi adicionado substrato de micropoços TMB com um componente às placas, incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, foi adicionada a solução de Parada. A absorbância foi lida a 450 nm usando um leitor de placas MAXline.

[0073] IgG2a Anti-HBs: placas de 96 poços foram revestidas durante a noite a 4 °C, com proteína de antígeno de superfície de hepatite B recombinante, Abcam (0,25 μg/ml em DPBS). No dia seguinte, as placas foram bloqueadas com soro de cabra a 10% em tampão de lavagem ELISA, por 1 hora a 37 °C. As placas foram lavadas com tampão de lavagem, seguido pela adição de diluições de 2 vezes, de soros individuais de camundongo; começando em 1:5.000 a 1:640.000.

As placas foram incubadas, por 1,5 horas a 37 °C, seguindo-se a lavagem das placas e adição do anticorpo secundário. Foi adicionado IgG2a anti-camundongo de cabra (Betil), diluído para 1:10.000 em 10% de soro de cabra em tampão de lavagem ELISA e as placas foram incubadas por 1,5 horas a 37 °C. Um substrato de micropoços TMB foi adicionado às placas e incubado em temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, foi adicionada a solução de parada. A absorbância foi lida a 450 nm usando um leitor de placas MAXline.

[0074] Os resultados são apresentados na Tabela 6 abaixo.

Tabela 6: Razões individuais de IgG1/IgG2

Número de Camundongo Individual	Razão de IgG1/IgG2a Formulação de HBsAg 10µg contendo 500 µg/mL de **[Al+++]** (Alhydrogel)	Razão de IgG1/IgG2a Formulação de HBsAg 20µg contendo 500 µg/mL de **[Al+++]** (Adjuphos)
1	5,3	2,5
2	36,5	3,6
3	118,3	5,6
4	19,9	0,1
5	35,9	6,9
6	2,0	4,6
7	20,5	0,9
8	N/A	9,4

[0075] Como pode ser visto na Tabela 6, a composição imunogênica da revelação contendo 20 µg de HBsAg e 500 µg/ml de alumínio como adjuvante de fosfato de alumínio estimula uma razão significativamente menor de IgG1 para IgG2a. Uma vez que a estimulação de IgG2a é um marcador para a atividade de Th1, essa razão alterada indica que a composição contendo 20 µg de HBsAg e 500 µg/ml de alumínio como adjuvante de fosfato de alumínio provoca uma resposta de Th1 mais forte do que a composição que compreende 20 µg de HBsAg e 500 µg/ml de alumínio como adjuvante de fosfato de alumínio.

Exemplo 6: Estudo de Variação de Dose em Camundongos após Vacinação com uma Vacina Profilática Disponível Comercialmente Conhecida como Sci-B-Vac (10 μg/ml de HBsAg Compreendendo S, Pré-S1 e Pré-S2 e 500 μg/ml de alumínio como adjuvante de hidróxido de alumínio) e Três Doses Diferentes da Composição da revelação compreendendo 20 μg, 40 μg e 60 μg de HBsAg e 500 μg/ml de alumínio como Adjuvante de Fosfato de Alumínio.

[0076] Esse exemplo descreve um estudo de variação de dose que examina a atividade de Th1 em camundongos após a vacinação com a vacina profilática comercialmente disponível conhecida como Sci-B-Vac que compreende 10 μg/ml de HBsAg compreendendo proteínas S, Pré-S1 e Pré-S2 e 500 μg/mL de alumínio como adjuvante de hidróxido de alumínio (TA6 na Tabela 3) e três doses diferentes compreendendo a mesma composição imunogênica de HBsAg da revelação e 500 μg/mL de alumínio como adjuvante de fosfato de alumínio. As três doses diferentes foram as seguintes HBsAg (20 μg/ml) (TA11 na Tabela 3); HBsAg (40 μg/ml) (TA10 na Tabela 3) e HBsAg (60 μg/ml) (TA 13 na Tabela 3).

[0077] Resumidamente, camundongos Balb/c (n = 8/grupo) foram vacinados por via intramuscular 3 vezes, com 3 semanas de intervalo com uma dose de camundongo de cada uma das composições, especificamente de 3 μg, 2 μg e 1 μg. Os esplenócitos foram colhidos de camundongos 7 dias após a 3ª vacinação e estimulados com grupamentos de peptídeos sobrepostos específicos para Pré-S1, Pré-S2 e HBsAg. As respostas de células T secretoras de IFN-γ foram avaliadas por ELISPOT após 48 horas de cultura como a seguir. Um dia antes da coleta e do processamento do baço, as placas ELISpot

(Millipore) foram revestidas com 100 µl de anticorpo de captura de interferon-gama (IFN-γ) a uma concentração de 15 µg/mL (Mabtech) e incubadas durante a noite a 4 °C.

[0078] No dia da coleta e do processamento do baço, as placas ELISpot revestidas foram lavadas 5 vezes com 200 µl de PBS estéril e bloqueadas com 100 µl de meio R10 por 1-2 horas. Uma vez que os esplenócitos foram isolados e contados, o meio de bloqueio R10 foi removido e 50 µl de esplenócitos (300.000 células) e 50 µl dos estimulantes foram colocados nas placas de ensaio ELISpot. Os esplenócitos de cada camundongo foram estimulados em duplicata com os seguintes estimulantes: Pré-S1 (concentração de estimulação final = 13,5 µg/ml), Pré-S2 (concentração de estimulação final = 5,5 µg/ml) e HBsAg (concentração de estimulação final = 27 µg/ml), R10 como controle negativo e forbol 12-miristato 13-acetato e ionomicina (PMA (20ng/ml)/ionomicina (1µg/ml) como controle positivo. As placas ELISpot foram então colocadas em uma incubadora úmida de 37 °C com CO_2 a 5% por 40-48 horas. Após a incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com 200 µl de PBS-Tween para remoção de esplenócitos, estimulantes e meios e 100 µl de anticorpo de captura de IFN-γ (Mabtech) a uma concentração de 1 µg/ml foi então adicionado a cada poço. Após uma incubação de 2 horas, as placas de ELISpot foram lavadas 5 vezes com PBC-Tween e 100 µl de estreptomicina-peroxidase de rábano (strep-HRP) diluída para 1:1000 foram adicionados a cada poço. As placas foram então incubadas por mais uma hora antes de serem cultivadas por 30 minutos em temperatura ambiente pela adição de 100 µL de Substrato de 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (BD BioSciences). Os pontos observados foram contados pela

ZellNet Consulting e os dados finais relatados como unidades formadoras de pontos (SFC) por um milhão de esplenócitos. A atividade de Th1 das diferentes composições, como medida por ELISPOT, é mostrada na Tabela 7.

Tabela 7: Atividade de Th1 como medida por ELISPOT

Composição Imunogênico	Pré-S1 (IFN-γ+ SFC/10^6 de esplenócitos)		Pré-S2 (IFN-γ+ SFC/10^6 de esplenócitos)		sAg (IFN-γ+ SFC/10^6 de esplenócitos)	
	M	SE	M	SE	M	SE
Formulação de HBsAg 20µg contendo 500 µg/mL de **[Al+++]** (Adjuphos)	1,665	1,044	261,2	62,43	498,0	125,4
Formulação de HBsAg 40µg contendo 500 µg/mL de **[Al+++]** (Adjuphos)	0,9514	0,4951	222,6	69,20	649,6	109,1
Formulação de HBsAg 60µg contendo 500 µg/mL de **[Al+++]** (Adjuphos)	0,7136	0,7136	148,9	31,01	422,0	102,0
Formulação de HBsAg 10µg contendo 500 µg/mL de **[Al+++]** (Alhydrogel)	0,0	0,0	108,4	36,95	226,4	28,54

[0079] Como pode ser visto na Tabela 7, a dose de 20 µg e 40 µg e 60 µg das composições compreendendo HBsAg compreendendo proteínas S, Pré-S1 e Pré-S2 e 500 µg/mL de alumínio como adjuvante de fosfato de alumínio foram capazes de provocar números maiores de células T secretoras de IFN-γ específicas de Pré-S2 e HBsAg por ELISPOT em comparação com 10 µg/ml de HBsAg compreendendo proteínas S, Pré-S1 e Pré-S2 e 500 µg/mL de alumínio como adjuvante de hidróxido de alumínio (TA6 na Tabela 3). Consequentemente, cada uma das três doses das composições imunogênicas da revelação induziu uma resposta de células T maior que a composição

compreendendo 10 μg/ml de HBsAg compreendendo proteínas S, Pré-S1 e Pré-S2 e 500 μg/mL de alumínio como adjuvante de hidróxido de alumínio.

Outras modalidades

[0080] Outras modalidades da revelação serão evidentes para os habilitados na técnica a partir de uma consideração do relatório descritivo ou da prática da revelação revelada nesse documento. Pretende-se que a especificação e os exemplos sejam considerados apenas exemplificativos, com o verdadeiro escopo da revelação sendo indicado pelas seguintes reivindicações. O teor de qualquer referência referida nesse documento é incorporado por meio desse documento por referência em sua totalidade.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição imunogênica, **caracterizada** pelo fato de que compreende:

(a) um antígeno HBsAg compreendendo proteína S, proteína Pré-S1 e proteína Pré-S2; e

(b) um adjuvante de fosfato de alumínio,

em que a composição compreende pelo menos 20 μg/ml de antígeno HBsAg e a quantidade de antígeno não adsorvido é de pelo menos 30%.

2. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o alumínio está presente em uma concentração de 500 μg/ml.

3. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que o antígeno HBsAg está presente em uma concentração de 20 μg/ml.

4. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que o antígeno HBsAg está presente em uma concentração de 40 μg/ml.

5. Composição imunogênica, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que o antígeno HBsAg está presente em uma concentração de 60 μg/ml.

6. Composição imunogênica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizada** pelo fato de que é para uso na indução de uma resposta de células Th1 em um mamífero.

7. Uso da composição imunogênica, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de ser para a fabricação de um fármaco para induzir uma resposta de células Th1 em um indivíduo.

8. Uso, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado**

pelo fato de que os indivíduos foram infectados com hepatite B.

9. Composição farmacêutica, **caracterizada** pelo fato de que compreende a composição imunogênica, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

10. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizada** pelo fato de que é para uso no tratamento de um indivíduo que sofre de hepatite B.

11. Método para induzir uma resposta de células Th1 em um mamífero, o referido método **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração da composição imunogênica como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 5.

12. Método de tratamento da Hepatite B em um indivíduo, o referido método **caracterizado** pelo fato de que compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição imunogênica, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, ao indivíduo.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que um tratamento adicional da hepatite B é administrado ao indivíduo antes da, simultaneamente à, ou após a, administração da composição imunogênica ao indivíduo.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de que o tratamento adicional da Hepatite B é um inibidor de nucleosídeo ou um interferon alfa peguilado.

15. Método, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de que o tratamento adicional da Hepatite B é um inibidor de polimerase, um inibidor de RNase

H, um agonista de TLR, um inibidor de N-glicosilação, um oligonucleotídeo antissentido, um anticorpo anti-hepatite B, um inibidor de capsídeo, um inibidor de proteína de núcleo, um modulador de montagem central, um redutor ou sequestrador de antígeno S, um polímero de ácido nucleico, um inibidor de DNA ccc, um interferon, um modulador imune ou um siRNA.

RESUMO

COMPOSIÇÕES IMUNOGÊNICAS PARA TRATAMENTO DE HEPATITE B

A presente divulgação fornece composições e métodos úteis para induzir uma resposta de células Th1 em um indivíduo que sofre de hepatite B. Como descrito nesse documento, as composições da divulgação compreendem HBsAg com proteínas S, Pré-S1 e Pré-S2 e um adjuvante de fosfato de alumínio. Em uma modalidade preferida, a composição imunogênica compreende pelo menos 20 μg/ml de antígeno HBsAg e a quantidade de antígeno não adsorvido é de pelo menos 30%.