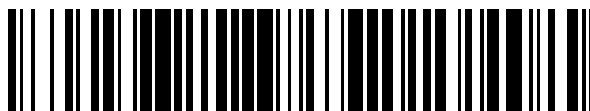


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 369**

51 Int. Cl.:
C07K 14/02 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06792095 .9**
96 Fecha de presentación: **15.09.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1924597**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.05.2008**

54 Título: **Vacunas que comprenden la proteína de núcleo HBC truncado mas adyuvantes basados en saponina**

30 Prioridad:
16.09.2005 EP 05020208

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.08.2012

73 Titular/es:
**RHEIN BIOTECH GESELLSCHAFT FÜR NEUE
BIOTECHNOLOGISCHE PROZESSE UND
PRODUKTE MBH
EICHSFELDER STRASSE 11
40595 DÜSSELDORF, DE**

72 Inventor/es:
**MELBER, Karl;
BUCHMANN, Pascale y
JANOWICZ, Zbigniew**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 386 369 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

Vacunas que comprenden la proteína de núcleo HBC truncado más adyuvantes basados en saponina

5 La presente invención se relaciona con una composición, con un proceso para la producción de una composición, con la composición que se puede obtener mediante este proceso, con una formulación farmacéutica, con el uso de la composición o de la formulación farmacéutica para terapia y/o profilaxis de infecciones por el virus de hepatitis B (VHB) y enfermedades mediadas por VHB, con el uso de la composición o de la formulación farmacéutica para la producción de un farmacéutico para terapia y/o para profilaxis de infecciones por VHB y enfermedades mediadas por VHB así como también con un proceso para terapia y/o para profilaxis de infecciones VHB y enfermedades mediadas por VHB.

10 De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que, más de 2 mil millones de personas viven hoy día o se han infectado con el virus de la hepatitis B (VHB). El VHB sin embargo pertenece a los agentes patogénicos humanos más significativos con enormes efectos en la salud humana.

15 Las infecciones con VHB ocurren por medio de la sangre, en particular de la madre infectada al neonato durante o brevemente después del nacimiento, por medio de productos de sangre contaminados y a través de intercambio sexual. El VHB representa un virus hepatotrófico, que puede provocar infecciones agudas y crónicas. Aunque una infección en el nacimiento o en el primer mes de vida lleva, en el 90 % de los casos, a una infección crónica, esto solo se observa en aproximadamente 10 % de los casos con infección en la adultez. En aproximadamente 2 % de los adultos infectados, puede ocurrir una hepatitis fulminante (falla aguda del hígado), que está ligada a un alto índice de muerte.

20 En primer lugar, una infección crónica puede no tener síntomas clínicos, pero se puede desarrollar después de un periodo de latencia de 10 a 30 años en enfermedad aguda del hígado (hepatitis B crónica, activa) debido a la persistencia del VHB y a la interacción patológica del sistema inmune con las células infectadas del hígado. El número de portadores VHB crónicos quienes desarrollan hepatitis B crónica es alrededor de 25 %. La hepatitis B crónica puede conducir finalmente a cirrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular primario. Ambas enfermedades
25 están vinculadas con un alto índice de muerte. Se estima que actualmente hay alrededor de 350 millones de portadores VHB crónicamente infectados en todo el mundo. Cada año, aproximadamente un millón de personas mueren por las consecuencias de una infección por VHB crónica.

30 Afortunadamente, las infecciones por VHB se pueden evitar mediante vacunas profilácticas contra hepatitis B. Tales vacunas, con base en el antígeno de superficie de hepatitis B purificado (HBsAg) del plasma de portadores crónicos, estuvieron disponibles por primera vez a principios de 1980. Finalmente, estos se reemplazan por los HBsAg producidos en forma recombinante. Sin embargo, en razón a que la vacunación no se introduce rutinariamente actualmente en todos los países, el VHB continuará representando una amenaza para la salud humana. En este contexto, es significativo que los portadores VHB crónicos se consideren como infecciosos y puedan transferir el virus.

35 La hepatitis B crónica es una enfermedad muy dinámica con un número de formas de aparición. En las etapas tempranas de infección crónica, uno habla de fase inmunotolerante, que se caracteriza por la presencia de marcadores víricos en el suero (VHB-ADN, HBsAg, HBeAg) así como también la carencia de problemas hepáticos. Alrededor de 25 % de los portadores VHB se transfieren en una fase inmunoactiva, en el curso en el cual aparecen los primeros síntomas del hígado y llega a ser necesaria una terapia. Durante esta fase inmunoactiva, el VHB-ADN
40 en el suero se reduce de manera general y las transaminasas en suero aumentan en forma de tanda. Aunque el HBsAg continúa estando presente en el suero, existe un porcentaje pequeño (alrededor de 1 %) de los pacientes, que experimentan espontáneamente una conversión de suero de HBeAg positivo a HBeAg negativo. Esta conversión de suero es un signo para la entrada en la etapa de portador inactivo, que se caracteriza por una baja actividad del virus. En pocos casos, se observa adicionalmente una seroconversión de HBsAg positivo a anti-HBsAg positivo, lo que se considera un signo de una infección curada. La hepatitis B crónica activa se caracteriza por necro-inflamación y fibrosis de los tejidos hepáticos, que conduce en el curso del tiempo a cirrosis y enfermedad hepática descompensada. Como complicación adicional, la cirrosis puede conducir a carcinoma hepatocelular primario, por lo tanto algunos portadores VHB crónicos también pueden desarrollar cáncer de hígado sin signos de cirrosis.

45 Las posibilidades de tratamiento para la hepatitis B crónica activa son muy limitadas. Actualmente, puede tener lugar un tratamiento con Interferón- α (por ejemplo Intrón A® o Roferón A®) o sustancias antivíricas (Lamivudina, Adefovir, Entecavir). Se utiliza preferiblemente interferón- α con pacientes HBeAg positivos, alrededor de 30 % reaccionan con una conversión de suero HBeAg, que se correlaciona con un estado de portador inactivo. Como resultado, unos pocos pacientes (alrededor de 3 %) también muestran una seroconversión de HBsAg como signo de una curación completa. Sin embargo, el tratamiento con Interferón- α , está vinculado con efectos colaterales severos, que
55 necesitan frecuentemente una detención temprana de la terapia. En pacientes HBeAg negativos, el Interferón- α muestra índices de respuesta bajos comparados con pacientes HBeAg positivos. Como alternativas, se pueden

utilizar aquí las sustancias antivíricas, que pertenecen a la clase de inhibidores de transcriptasa inversa de nucleósido/nucleótido. Estas sustancias antivíricas inhiben la replicación del virus y, como resultado, evitan el avance de la enfermedad del hígado. Los índices de conversión de suero para pacientes HBeAg positivos son menores, comparado con Interferón- α , y no son mayores que la remisión de ocurrencia espontánea. El objetivo de la terapia antivírica es sin embargo retrasar la enfermedad mediante la reducción de la actividad vírica durante un tiempo no limitado. El uso a largo plazo de las sustancias antivíricas, sin embargo, se ve perjudicado mediante la aparición de mutantes resistentes al virus. En el caso de la sustancia más frecuentemente utilizada, Lamivudina, se ha observado un índice de resistencia de hasta 68 % dentro de cuatro años. La introducida más recientemente, Adefovir, parece provocar resistencia con menos frecuencia. El problema básico de resistencia al virus representa, sin embargo, una amenaza inherente para tratamiento a largo plazo, aún si las sustancias antivíricas se deben utilizar en combinación. Existe, por lo tanto, una necesidad urgente de medios terapéuticos adicionales para tratar la hepatitis B crónica. Particularmente son deseables agentes inmunomoduladores con pocos efectos colaterales y con la perspectiva de una terapia corta para los pacientes.

Tal alternativa es la inmunoterapia específica en la forma de una vacuna terapéutica. El concepto de una vacuna terapéutica es estimular específicamente el sistema inmune de un paciente con hepatitis B crónica en tal forma que se inicie una respuesta inmune adecuada contra el virus, que conduce finalmente al control del virus y frena el avance de la enfermedad hepática. Uno de los efectos obvios que debe mostrar una vacuna terapéutica es la ruptura a través de la intolerancia que se encuentra en la presencia de grandes cantidades de antígenos víricos. La terapia, en particular, debe generar respuestas de célula T específicas de virus, en particular linfocitos T citotóxicos (CTL) contra diversos antígenos de VHB. Comparado con la situación para infección aguda, en pacientes con hepatitis B crónica, exactamente estas respuestas inmunes solo se pueden mostrar en un grado muy pequeño, o no mostrar en lo absoluto. Las respuestas CTL específicas de virus fuerte se ven de manera general como representantes del control de infecciones víricas. El desarrollo de una vacuna terapéutica tiene, por lo tanto, como objetivo principal, la inducción de respuestas CTL antivíricas fuertes.

Las vacunas subunitarias recombinantes no son de manera general capaces de provocar respuestas CTL. En modelos de animal (ratón), las respuestas CTL significativas con vacunas de ADN, en particular se pueden lograr vacunas de ADN con base en un vector de plásmido que codifica un antígeno del núcleo de hepatitis B (HBcAg), sin embargo, las vacunas actuales muestran a la fecha en humanos solo una respuesta inmune muy débil y no estimulan ninguna respuesta potente CTL. Debido a estas dificultades, las así llamadas "Vacunas de Refuerzo Principal" se han desarrollado actualmente, por lo que tiene lugar la inmunización alternadamente con una vacuna de ADN (por ejemplo codificación para HBsAg) y un vector de virus recombinante (por ejemplo Cepa Virus de la Vaccina Modificada Ankara), que, por ejemplo expresa el HBsAg (ver McConkey S.J., Schneider J., Mendy M., Cavanaugh J.S., Bertolotti A., Whittle H., Hill A.V.S.: "Safety and Immunogenicity of a novel "prime boost" therapeutic immunization strategy against hepatitis B virus", Meeting abstract: "The molecular biology of hepatitis B viruses", Bergamo, Italy, September 7-10, 2003).

La WO-A-01/98333 describe el uso de un antígeno HBc, en el que uno o más de cuatro unidades de repetición de arginina en el terminal C se retira, pero se retiene el residuo de cisteína de terminal C inter alia para el tratamiento terapéutico de VHB. Las unidades de repetición de arginina retiradas se pueden reemplazar por las secuencias que representan los epítomos de patógenos bacterianos o víricos, parásitos, alérgenos o antígenos asociados con cáncer, que se reconocen por las células T auxiliares, células B o linfocitos T citotóxicos.

La WO-A-2005/023297 describe una composición para el tratamiento de infecciones por VHB y enfermedades mediadas por VHB, que comprenden por lo menos dos antígenos de superficie de hepatitis B (HBsAg), fragmentos de los mismos y/o ácidos nucleicos que los codifican, por lo que el HBsAg en el genotipo VHB en la región S y/o la pre-región-S1 son diferentes y por lo que la composición no comprende HBcAg o ácidos nucleicos que codifican esto.

La WO-A-2005/056051 describe inter alia un polipéptido recombinante para el tratamiento o profilaxis de una infección por hepatitis B, por lo que la composición comprende una pluralidad de componentes, preferiblemente por lo menos tres o todos los cuatro seleccionados de a) un elemento de polipéptido de núcleo, que comprende una secuencia de la región inmunogénica de la proteína de núcleo VHB, b) un elemento de antígeno-polipéptido de superficie, que comprende una secuencia de la región inmunogénica del antígeno-proteína de superficie VHB (S, M o L), c) un elemento de polipéptido X, que comprende una secuencia de la región inmunogénica de la proteína VHB-X y d) un elemento de polimerasa-polipéptido, que comprende una secuencia de la región inmunogénica de las proteínas de polimerasa VHB, por lo que por lo menos uno de los elementos comprende por lo menos 100 aminoácidos de las proteínas VHB respectivas.

La EP-A-1 136 077 describe una composición de vacuna para aplicación nasal, que comprende un HBsAg y opcionalmente un HBcAg, que, inter alia, también se puede utilizar como vacunas terapéuticas.

Chen Xinchun et al. (Vaccine, Vol. 22, Issues 3-4, páginas 439-446, 2004) describe un antígeno recombinante del núcleo de hepatitis B que lleva los epítomos preS1 que inducen la respuesta inmune contra la infección crónica VHB.

Pearse et al. (Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 57, Issue 3, páginas 465-474, 2005) describe el uso del adyuvante ISCOMATRIX® para el suministro de antígeno.

- 5 Aguilar et al. (Immunology and Cell Biology, Vol. 82, Issue 5, páginas 539-546, 2004) trata con el desarrollo de una vacuna nasal para la infección por hepatitis B crónica que utiliza la capacidad del antígeno del núcleo de hepatitis B para estimular una respuesta fuerte Th1 contra el antígeno de superficie de hepatitis B.

JP 08 059695 A describe un nuevo polipéptido, que tiene una secuencia de aminoácidos específica, capaz de manifestar la antigenicidad del virus de hepatitis B y la antigenicidad cercana a aquella de un producto natural.

- 10 Sons-HS et al. (Molecular Biology of the Cell, Vol. 7, Issue 2, páginas 176-186, 1997) describe el efecto de un adyuvante novedoso de saponina derivado de Quillaja saponaria en respuesta inmune al antígeno recombinante de superficie de hepatitis B.

Pumpens-P et al. (Intervirology, Vol. 44, Issues 2-3, páginas 98-114, 2001) se dirige al uso de partículas núcleo VHB como un Portador para los Epítomos de Célula B /Célula T.

- 15 Boulter-NR et al. (Vaccine, Vol. 13, Issue 13, páginas 1152-1160, 1995) describe una proteína de fusión en donde el antígeno Theileria annulata sporozoite se fusiona al antígeno del núcleo de hepatitis B y el uso de tal proteína de fusión en un ensayo de vacuna.

La presente invención tiene el objeto de superar las desventajas conocidas de la técnica anterior para vacunas para el tratamiento o profilaxis de una infección de hepatitis B en humanos.

- 20 En particular, la presente invención tiene el objeto de proporcionar una composición adecuada para el tratamiento de un humano, que, en comparación con las composiciones conocidas de la técnica anterior, conduce a respuestas inmunes fuertes, en particular respuestas CTL fuertes contra el HBcAg, en pacientes con una infección VHB crónica. La composición debe conducir a ruptura a través de la tolerancia inmunológica en tantos pacientes como sea posible con una infección VHB crónica, independiente de su tipo HLA.

- 25 La composición de acuerdo con la invención debe permitir una ruptura a través de la tolerancia inmunológica, independiente de los genotipos VHB del paciente crónico y así conduce a la generación de una respuesta inmune que mantiene el virus bajo control.

La presente invención adicionalmente tiene el objeto de proporcionar un proceso con el cual se puede obtener una composición con las ventajas descritas anteriormente con poca complejidad preparativa como sea posible.

- 30 Se proporciona una contribución a la solución del objeto mencionado anteriormente mediante una composición, que comprende:

i) un HBcAg_{1-x} (HBcAg = antígeno núcleo VHB), por lo que x es un número entero del rango de 100 a 160, preferiblemente del rango de 120 a 150, particularmente preferiblemente del rango de 140 a 149, aún más preferiblemente del rango de 144 a 146 y más preferiblemente igual a 145, o una variante de este antígeno,

- 35 ii) un adyuvante que comprende una saponina en donde el adyuvante es un complejo de saponina, y

iii) un HBsAg o una variante de este antígeno.

- 40 Completamente sorprendente, sin embargo no obstante lo ventajoso, se observa que, con la composición descrita anteriormente, que es en principio adecuada para uso en humanos, se pueden obtener respuestas CTL específicas de núcleo fuertes en el modelo de animal, que son más o menos comparables con aquellas respuestas CTL que se obtienen utilizando un vector de plásmido que codifica HBcAg (inmunización de ADN) en el mismo modelo de animal.

- 45 El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no cae dentro de las reivindicaciones se proporciona solo para información. El término "polipéptido" utilizado en los siguientes detalles se relaciona con un polímero de aminoácidos y no se restringe a un número mínimo particular de aminoácidos. Por lo tanto comprende polipéptidos iguales, oligopéptidos, dímeros, trímeros, oligómeros, partículas y similares. Adicionalmente, el término "polipéptidos" comprende no solo los polímeros puros de aminoácidos, que se obtienen

directamente después de traducción en las ribosomas, pero también aquellos polipéptidos que se obtienen post-transduccionalmente mediante glucosilación, acetilación, fosforilación y similares.

"HBcAg_{1-x}" se entiende de acuerdo con la invención un polipéptido que comprende los aminoácidos 1 a x del HBcAg natural, que consiste preferiblemente de los aminoácidos 1 a x del HBcAg natural, por lo que el término "HBcAg_{1-x}" se debe entender como todos los polipéptidos concebibles con los aminoácidos 1 a x (por lo que el primer aminoácido (= aminoácido 1) es que en el extremo del terminal N del polipéptido) del HBcAg de los 8 genotipos estándar A, B, C, D, E, F, G y H actualmente utilizados. Estos 8 genotipos estándar difieren entre sí en aproximadamente 8 % de la secuencia de nucleótidos (ver Bartholomeusz, Rev. Med. Virol. 13 (2003), 1-14), por lo que las variaciones se relaciona predominantemente con el gen HBsAg. Preferiblemente el genotipo A VHB comprende la secuencia de ácidos nucleicos de referencia Genbank X02763 o respectivamente el genotipo VHB Aafr comprende la secuencia de ácidos nucleicos de referencia de acuerdo con Genbank AF297621. Para el genotipo VHB Ba la secuencia de ácidos nucleicos de referencia es Genbank D00330, para el genotipo Bj, la secuencia de ácido nucleico de referencia AB073858. Para el genotipo VHB C, la secuencia de ácido nucleico de referencia es Genbank AY206389, para el genotipo Caus, la secuencia de ácido nucleico de referencia de acuerdo con Genbank AB048704. Para el genotipo D, la secuencia de ácido nucleico de referencia es Genbank X02496, para el genotipo E, Genbank X75657, para el genotipo F, Genbank X69798, para el genotipo G, Genbank AF160501 y para el genotipo H, Genbank AY090454.

El término "variante" del HBcAg_{1-x} se entiende un polipéptido en el que 5 aminoácidos, particularmente preferiblemente más de 2 aminoácidos y más preferiblemente más 1 aminoácido del HBcAg_{1-x} se ha eliminado, insertado, sustituido o adjuntado en los extremos de terminal C y/o N, preferiblemente sustituido. El término "variantes" también comprende polipéptidos de fusión, en particular fusiones con HBsAg, que comprende HBcAg_{1-x}.

Bajo el término "adyuvante" se entiende de acuerdo con la invención un compuesto que permite la inducción de una respuesta inmune, preferiblemente la inducción de una respuesta CTL con el antígeno.

Los HBcAg_{1-x} que están comprendidos en la composición de acuerdo con la invención y que se truncan comparado con el HBcAg natural, del que por lo menos parte de la región de unión de ácido nucleico de terminal C, preferiblemente la región de unión de ácido nucleico de terminal C completo que carece, se puede obtener mediante procesos de recombinación conocidos por la persona experta.

Una posibilidad es amplificar la estructura de lectura de núcleo o prenúcleo de un virus aislado por medio de una reacción de cadena polimerasa (PCR). También se concibe preparar la secuencia de ADN correspondiente sintéticamente y luego amplificar por medio de PCR. El fragmento PCR obtenido luego se clona en un vector de plásmido. Por medio de clonación PCR adicional, la forma correspondientemente acortada luego se puede insertar dentro de un vector de expresión, por ejemplo en un vector de expresión E. coli. Por lo que, la inserción ocurre preferiblemente en tal forma que el gen que codifica HBcAg_{1-x} o el fragmento o la variante respectivamente está bajo el control de un promotor activo. El vector de expresión puede comprender simultáneamente elementos de inducción para aumentar el índice de expresión. Después de la transformación de este vector de expresión en E. coli, se obtienen clones individuales, que expresan el HBcAg_{1-x} o el fragmento o las variantes respectivamente. Con el fin de obtener los polipéptidos que sirven como antígenos, un clon individual se inyecta en el medio de cultivo y se cultiva durante la noche a 37° C en el matraz de agitación. El cultivo E. coli primero se cosecha mediante centrifugación. El glóbulo bacteriano se re-suspende en solución reguladora y luego se interrumpe por tratamiento de ultrasonido o mediante homogenización de alta presión. El HBcAg o las variantes de HBcAg situadas respectivamente en el homogenizado se concentran mediante precipitación con sulfato de amonio y luego se purifican de componentes anfitriones bacterianos mediante filtración de gel. Las variantes HBcAg formadoras de partículas se pueden purificar adicionalmente por una centrifugación de zona de velocidad. Los HBcAg_{1-x} deficientes de partícula se construyen por ingeniería en forma ideal con un marcador de afinidad de la Etiqueta His de terminal N y se purifican por medio de una cromatografía de afinidad Ni-NTA y filtración de gel posterior. Los HBcAg_{1-x} así producidos se someten a una filtración estéril y se utilizan como tal para la formulación de la composición de acuerdo con la invención.

En principio los HBcAg_{1-x} o sus variantes comprendidas en la composición de acuerdo con la invención también se pueden obtener sintéticamente.

Los detalles adicionales relacionados con técnicas de preparación sintética o recombinante de polipéptidos se pueden encontrar en

- Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (1989);
- "DNA Cloning", Volumes I y II (D. N. Glover, editor., 1985);
- "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, editor, 1986);

- "Nucleic Acid Hybridization" (B. D. Hames & S. J. Higgins, editors, 1984);
- "Transcription and Translation" (B. D. Hames & S. J. Higgins, editors, 1984);
- "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, editors, 1986);
- 5 - "Immobilised Cells and Enzymes" (IRL Press, 1986); - B. Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning" (1984);
- "The Methods in Enzymology series" (Academic Press, Inc.), in particular Volumes 154 y 155;
- "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J. H. Miller y M. P. Calos, editors, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory);
- 10 - Mayer and Walker, editors, (1987), "Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology" (Academic Press, London);
- Scopes, (1987), "Protein Purification: Principles and Practice", second edition (Springer-Verlag, N.Y.) y
- "Handbook of Experimental Immunology", Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, editors, 1986)

En principio, los HBcAg_{1-x} comprendidos en la composición de acuerdo con la invención pueden formar partícula o no formar partícula, por lo que se prefieren HBcAg_{1-x} que forman partícula. Los HBcAg_{1-x} que forman partícula se pueden asociar para formar lados de tapas con un diámetro de aproximadamente 27 nm. 180 o 240 dímeros asociados para formar estructuras macromoleculares. De acuerdo con una realización particularmente preferida de la composición de acuerdo con la invención, los HBcAg_{1-x}, por lo tanto, están presentes en la forma de las partículas descritas anteriormente.

Los antígenos preferidos de acuerdo con la invención son en particular el HBcAg1-124, HBcAg1-127, el HBcAg1-144, el HBcAg1-145, el HBcAg1-146, el HBcAg1-147, el HBcAg1-148 y el HBcAg1-149, (es decir polipéptidos que comprenden, preferiblemente que consisten de los primeros 127, 144, 145, 146, 147, 148 o 149 aminoácidos del HBcAg natural). Un antígeno preferido adicional es HBcAg1-144+AS, un polipéptido que comprende los primeros 144 aminoácidos de los HBcAg que ocurren en forma natural y que como el aminoácido 145 comprende un aminoácido AS que es diferente al ácido glutámico que aparece como el aminoácido 145 en el HBcAg que ocurre en forma natural, por lo que este aminoácido AS que es diferente al ácido glutámico es preferiblemente isoleucina. En la composición de acuerdo con la invención, los antígenos que son particularmente preferiblemente comprenden HBcAg1-145 y HBcAg1-144+1.

Se prefiere adicionalmente de acuerdo con la invención que el HBcAg_{1-x} no comprende cualesquier epítomos que son externos para HBcAg, en particular no epítomos HBsAg. Más preferiblemente, los HBcAg_{1-x} no comprenden epítomos pre-S1, en particular no los aminoácidos 3 a 55 del preantígeno-S1. También se prefiere de acuerdo con la invención que el HBcAg1-x no comprenda el residuo cisteína en la posición x del terminal C, mientras x no es igual a 48, 61 o 107.

De acuerdo con una realización particular de la composición de acuerdo con la invención, este comprende por lo menos dos HBcAg_{1-x} o variantes de los mismos, por lo que el HBcAg_{1-x} difiere en el genotipo VHB.

35 La composición de acuerdo con la invención comprende un adyuvante que comprende una saponina. Este adyuvante es un complejo de saponina. Particularmente preferiblemente, el complejo de saponina es un complejo de saponina liposómico.

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no cae dentro de las reivindicaciones se proporciona solo para información.

40 En este contexto se prefiere particularmente que el complejo saponina, comprenda, como componentes que son diferentes al agua o las soluciones salinas acuosas

(α1) 0 a 95 % en peso, particularmente preferiblemente 10 a 50 % en peso y más preferiblemente 15 a 25 % en peso de un fosfolípido,

45 (α2) 0 a 95 % en peso, particularmente preferiblemente 10 a 50 % en peso y más preferiblemente 15 a 25 % en peso de un esteroide,

(α3) 5 a 100 % en peso, particularmente preferiblemente 15 a 90 % en peso y más preferiblemente 30 a 80 % en peso de la saponina o del derivado saponina, y

(α4) 0 a 20 % en peso, particularmente preferiblemente 1 a 15 % en peso y más preferiblemente 5 a 10 % en peso aditivos adicionales, por ejemplo lípidos adicionales que son diferentes a los fosfolípidos y lípidos esteroides o solventes que son diferentes al agua,

por lo que las cantidades en peso se basan respectivamente en el peso total del complejo de saponina, con la excepción de su porción de agua o de sus porciones de soluciones salinas acuosa, y la suma de los componentes (α1) a (α4) es 100 % en peso.

Los complejos de saponina de este tipo también se mencionan en la literatura inter alia como "Matriz ISCO®". Si la composición también comprende proteínas como antígenos además de los componentes (α1) a (α4), el complejo luego se denomina como "ISCOM®".

Los fosfolípidos (α1) son preferiblemente fosfolípidos seleccionados del grupo que consiste de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y dipalmitoilfosfatidilcolina.

Los esteroides (α2) son preferiblemente esteroides de origen de planta o animal seleccionados del grupo que consiste de colesterol, lanosterol, lumisterol, estigmasterol y sitosterol.

Como saponinas se entienden de acuerdo con la invención preferiblemente compuestos químicos entre un azúcar y un esteroide, alcaloide esteroide o triterpeno o mezclas de estos compuestos. Estos también se pueden denominar como saponinas esteroides, saponinas alcaloides esteroides y saponinas triterpeno. Tales saponinas son glicosidas activas de superficie y se pueden obtener de plantas, por lo que las saponinas que son más efectivas como adyuvantes se obtienen del árbol Sur Americano Quillaja saponaria, preferiblemente de la corteza de este árbol. Durante el aislamiento de la saponinas de Quillaja saponaria, se obtiene un extracto que en la forma parcialmente purificada se conoce como "Quil A" (el extractor de saponina parcialmente purificado tiene un contenido de saponina triterpeno definido y es menos tóxico que el extracto de saponina crudo).

Las saponinas adecuadas adicionales se describen en R. Tschesche and Wulf, "Chemie und Biologie der Saponine in Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe", publicado por H. Herz, H. Grisebach, G. W. Kirby, Vol. 30 (1973), en particular saponinas polares fuertes tales como las saponinas polares triterpeno, en particular las bisdesmosidas acéticas polares, por ejemplo el extracto de saponina de Quillajabark Aralosid A, Chikosetsusaponin IV, Calendula-Glycoside C, Chikosetsusaponin V, Achyrranthes-Saponin B, Calendula-Glycoside A, Aralosid B, Aralosid C, Putranji-Saponin III, Bersamasaponinid, Putrajia-Saponin IV, Trichosid A, Trichosid B, Saponasid A, Trichosid C, Gypsosid, Nutanosid, Dianthosid C, Saponasid D, preferiblemente Aescin de Aesculus hippocastanum (T. Patt and W. Winkler: "Das therapeutisch wirksame Prinzip der Rosskastanie (Aesculus hippocastanum)", Arzneimittelforschung 10(4), 273-275 (1960)).

La saponina (α3) es preferiblemente el extracto de saponina parcialmente purificado de la corteza de Quillaja saponaria denominado como "Quil A", consiste de por lo menos 22 fracciones de saponina diferentes, sub-fracciones de esta fracción Quil A homogénea, tal como, por ejemplo, QS 7, QS 17, QS 18 o QS 21, o una mezcla de por lo menos dos de las sub-fracciones obtenidas de la fracción Quil A homogénea, preferiblemente una mezcla de las sub-fracciones A y C, como se describe en la WO-A-96/11711. Esta mezcla consiste preferiblemente de 50 a 90 % en peso de la fracción A y 10 a 50 % en peso de la fracción C, por lo que las fracciones A y C se obtienen de acuerdo con el ejemplo 1 de la WO-A-96/11711. Las mezclas de esta clase están comercialmente disponibles, por ejemplo bajo la referencia "ISCOPREP®703". De acuerdo con una realización particular, la saponina también puede consistir de 100 % en peso de la fracción C. Además de la saponina de Quil A, los derivados de saponina, como se describe, por ejemplo, en la US 6,262,029, también puede estar comprendido en el complejo. Los complejos de saponina adecuados de acuerdo con la invención son, en particular, los productos comercialmente obtenibles AbISCO®-100, AbISCO®-200, AbISCO®-300 (ISCONOVA, Uppsala, Suecia) o Stimulon®QS-21 (ANTIGENICS, Woburn, USA).

La producción de los complejos de saponina descritos anteriormente (matriz ISCO®) se pueden llevar mediante cualquier proceso para la producción de tales complejos que se conoce por la persona experta en la técnica. Los procesos preferidos para la producción de complejos de saponina de estos tipos, por ejemplo, se describen en la EP-A-0 231 039 (complejos de saponina liposómicos) o en la WO-A- 90/03184 (complejos de saponina no liposómicos).

Si una matriz ISCO está comprendido en la composición de acuerdo con la invención como adyuvante, se prefiere adicionalmente de acuerdo con la invención que el antígeno o los antígenos se ubiquen o no se ubiquen en el lado de la matriz ISCO®, como en el caso con los ISCOM conocidos.

De acuerdo con una realización particular de la composición de acuerdo con la invención, esto también puede comprender como co-adyuvantes, además del complejo de saponina, adyuvantes adicionales que no comprenden saponina o el derivado de saponina, por lo que estos coadyuvantes pueden estar presentes separados del complejo o integrados en este complejo. Como co-adyuvante, cualquier adyuvante conocido por la persona experta se puede utilizar que se utiliza comúnmente en las vacunas. Los adyuvantes preferidos se seleccionan del grupo que comprende adyuvantes en partículas, tales como, por ejemplo, sub-micro emulsión aceite en agua, a la que pertenece, por ejemplo, MF59 (5 % de Escualeno, 0,5 % de Tween® 80 y 0,5 % de Span® 85), SAF (10 % de Escualeno, 0,4 % de Tween® 80, 5 % del polímero bloqueado con Plurón) y el dipéptido thr-muramilo (thr-MDP), los compuestos minerales tales como, por ejemplo, hidróxido de aluminio, sulfato de aluminio o fosfato de aluminio, adyuvante incompleto de Freund, lipopolisacáridos, N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-alanil-dipéptido (GMDP) o muramidipéptido (MDP), GAL-ceramida, bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB), liposomas, que comprende preferiblemente fosfolípido y colesterol, micropartículas de polímeros biodegradables tales como poli-lacturo-co-glicolida (PLGA), oligodesoxiribonucleótidos con o sin el motivo CpG, cloruro de N,N-di-(β-estearoiletil)-N,N-dimetilamonio (EQ1), glicopéptidos, componentes de la pared celular de micobacterias, aminas cuaternarias tales como, por ejemplo, cloruro de cetilpiridinio y cloruro de benzalconio, aminas de iones dipolares tales como CHAPS (3-(3-colamidopropil)-dimetil-amonio)-1-propanosulfonato), sulfato de dextrano, factor estimulante de las colonias de macrófagos de granulocito (GM-CSF), factor de necrosis de tumor (TNF), copolímeros de bloque tales como, por ejemplo, P1205 o Poloxámero 401, dimiristoulofosfatidilcolina (DMTC), 3β-hidroxi-5-androsten-17-ona (DHEA), dimiristoilfosfatidil-glicerol (DMPG), sal de sodio de ácido desoxicólico, Imiquimod, DTP-GDP, 7-ail-8-oxoguanosina, Montanide ISA® 51, Montanide ISA® 720, murametida, murapalmitina, dicetilfosfato, metacrilato polimetilo (PMMA), ésteres de ácido graso de PEG-sorbitan tales como polisorbato 20 o 80 (TWEEN® 20, 80), mutantes destoxificados de toxinas ribosilantes de ADP bacteriano tales como la toxina del cólera o toxina pertussis o mezclas de por lo menos dos de estos adyuvantes. Particularmente se prefieren como coadyuvantes lipopolisacáridos, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, GAL-ceramida, oligodesoxiribonucleótido con el motivo CpG, así como también ésteres de ácido grado de PEG-sorbitán.

Un resumen general de los compuestos adecuados como co-adyuvantes se presenta en Cox, J.C. and Coulter, A.R. "Adjuvants - a classification and review of their modes of action" in Vaccine 15:248-256 (Feb. 1997).

La composición de acuerdo con la invención comprende adicionalmente, además del antígeno HBcAg_{1-x} y el adyuvante por lo menos un HBsAg, o una variante de este antígeno. En este contexto se prefiere particularmente que no solo el HBcAg_{1-x} sino también el HBsAg están presentes en forma de partículas en la composición de acuerdo con la invención.

El HBsAg es una proteína de 226 aminoácidos (p24/gp27 o proteína S), que se autoensambla en partículas de lipoproteína de 20-30 nm, en la que alrededor de 100-150 sub-unidades se entrecruzan por medio de múltiples enlaces disulfuro inter e intra-moleculares. El HBsAg opcionalmente comprendido en la composición de acuerdo con la invención se puede derivar de todos los 8 genotipos estándar VHB A, B, C, D, E, F, G y H conocidos en este momento, en la misma forma como el HBcAg_{1-x}. El término "HBsAg" también comprende adicionalmente, además de la proteína de 226 aminoácidos, las proteínas M- y L, que, además del HBsAg también comprenden el prepéptido S2 de 55 aminoácidos largo (proteína M) o el prepéptido S2 largo de 55 aminoácidos y el prepéptido S1 largo de 120 aminoácidos (proteína L).

El término "variantes" del HBsAg o del fragmento del HBsAg se entiende un polipéptido en el que más de 5, preferiblemente más de 2 y particularmente preferiblemente más 1 de aminoácido de HBsAg es eliminado, insertado, adjuntado en los extremos o sustituido, preferiblemente sustituido.

De acuerdo con la realización preferida de la composición de acuerdo con la invención, esta comprende no solo el HBsAg, sino, como se describe en la WO-A-2005/02397, por lo menos dos HBsAg o fragmentos o variantes de los mismos, por lo que el HBsAg difiere en el genotipo VHB en la región S y/o en la pre-región S1. En este contexto se prefiere particularmente que los dos HBsAg que difieren en el genotipo VHB están presentes en la forma de partículas homólogas, como se describe en forma similar en la WO-A-2005/02397. Una partícula HBsAg homóloga se entiende una partícula que está compuesta únicamente de HBsAg del mismo genotipo VHB.

El HBsAg se puede obtener mediante los procesos conocidos por la persona experta, del suero de pacientes con hepatitis B crónica, sintéticamente o como polipéptidos recombinantes. En este contexto, se hace referencia a los métodos descritos anteriormente en relación con el obtenido de HBcAg_{1-x}.

La composición de acuerdo con la invención también puede comprender aditivos adicionales iv), tales como aditivos o portadores farmacéuticos, además de los componentes i), ii) y iii), en particular si está presente como formulación farmacéutica.

Los portadores farmacéuticos preferidos son en particular agua, agua regulada, preferiblemente soluciones salinas isotónica tales como PBS (Solución Salina Regulada con Fosfato), glucosas, dextrosas, manitol, lactosas,

5 almidones, estearato de magnesio, celulosas, carbonato de magnesio, 0.3 % de glicerol, ácido hialurónico, etanol, polialquilenglicoles tales como polipropilenglicol, triglicéridos o similares. El tipo de portador farmacéutico utilizado es particularmente dependiente de si la composición de acuerdo con la invención se formula para administración oral, nasal, intradérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa. Como aditivos, los reguladores de tonicidad, agentes humectantes, emulsificantes o sustancias reguladoras pueden estar comprendidos en la composición de acuerdo con la invención.

10 Las relaciones en peso relativas entre los componentes de antígeno i) y iii) a adyuvante ii) preferiblemente subyacen dentro de un rango de 1 : 20 a 20 : 1, particularmente preferiblemente dentro de un rango de 1 : 10 a 10 : 1, todavía más preferiblemente dentro de un rango de 1 : 5 a 5 : 1 y más preferiblemente dentro de un rango de 1 : 2 a 2 : 1. La relación en peso entre el adyuvante y el antígeno que es óptimo para facilidad de aplicación respectiva se puede determinar mediante la persona experta por medio de ensayos simples, en los que, por ejemplo, se determina la resistencia de la respuesta CTL que depende de esta relación en peso.

15 La relación en peso entre el HBcAg_{1-x} y el HBsAg preferiblemente subyace dentro de un rango de 1 : 20 a 20 : 1, particularmente preferiblemente dentro de un rango de 1 : 10 a 10 : 1, todavía más preferiblemente dentro de un rango de 1 : 5 a 5 : 1 y más preferiblemente dentro de un rango de 1 : 2 a 2 : 1. La persona experta también puede determinar la relación de peso óptima aquí por medio de ensayos simples.

20 La concentración total de los componentes i), ii) y iii) en la composición de acuerdo con la invención (es decir la cantidad total de los componentes i), ii) y iii) con base en el volumen de la composición de acuerdo con la invención) preferiblemente subyace dentro de un rango de 0.1 a 2,000 µg/ml, particularmente preferiblemente dentro de un rango de 0.5 a 1,500 µg/ml, todavía más preferiblemente dentro de un rango de 1 a 1,000 µg/ml y más preferiblemente dentro de un rango de 10 a 500 µg/ml, mientras la composición de acuerdo con la invención no está presente como liofilizado.

De acuerdo con una realización de la composición de acuerdo con la invención la invención, esta comprende

- 25 i) un HBcAg₁₋₁₄₅,
- ii) un complejo de saponina como adyuvante, preferiblemente un complejo de saponina liposómico, y
- iii) un HBsAg.

De acuerdo con una realización adicional de la composición de acuerdo con la invención, esta comprende

- 30 i) un HBcAg₁₋₁₄₄₊₁,
- ii) un complejo de saponina como adyuvante, preferiblemente un complejo liposómico, y
- iii) un HBsAg.

35 La composición de acuerdo con la invención preferiblemente se caracteriza adicionalmente en que este tiene una frecuencia de célula T CD8+ específica de HBcAg en el bazo de por lo menos 30, particularmente preferiblemente por lo menos 50, todavía más preferiblemente por lo menos 75, aún más preferiblemente por lo menos 100 y más preferiblemente por lo menos 300 células T CD8+ IFNγ+ por células T 105CD8+ en ratones C57BL/6 con una inmunización de acuerdo con el proceso de inmunización descrito aquí y posterior reestimulación descrita aquí con MGLKFRQL (un fragmento sintético de HBcAg).

40 La composición de acuerdo con la invención preferiblemente se caracteriza adicionalmente porque, esta induce en respuestas de anticuerpo potentes de ratones C57BL/6 contra HBsAg con una inmunización de acuerdo con el proceso de inmunización descrito aquí. El conteo total de anticuerpo anti-HBs, determinado de acuerdo con el ensayo AUSAB® descrito aquí de hasta, en promedio, por lo menos 100 mIU/mL, preferiblemente por lo menos 500 mIU/mL, particularmente preferiblemente por lo menos 1,000 mIU/ml y más preferiblemente por lo menos 1,500 mIU/mL. La determinación de la clase de isotipo de IgG específico de anti-HBs muestra que se aumentan los conteos IgG1- y IgG2b, que es una indicación de la formación de una respuesta inmune Th1 y una respuesta inmune Th2.

45 Una contribución adicional a la solución del objeto mencionado anteriormente se proporciona por un proceso para la producción de una composición, que comprende las etapas del proceso I), In y IV) y III):

I) provisión de un HBcAg_{1-x}, por lo que x es un número entero del rango de 100 a 160, preferiblemente el rango de 120 a 150, particularmente preferiblemente el rango de 140 a 149, todavía más preferiblemente el rango de 144 a 146 y más preferiblemente es igual a 145, o de una variante de este antígeno,

II) provisión de un adyuvante que comprende una saponina, en donde el adyuvante es un complejo de saponina,

5 III) provisión de un HBsAg, o de una variante de este antígeno, y

IV) poner en contacto del HBcAg_{1-x}, del adyuvante y del HBsAg.

Como HBcAg_{1-x} o variante del mismo, como adyuvante que comprende una saponina, así como también como HBsAg o como variante del mismo, se prefieren aquellos compuestos que ya se mencionaron como componentes preferidos i), ii) y iii) en relación con la composición de acuerdo con la invención.

10 Con respecto a las etapas del proceso I) y III), se prefiere que la provisión del HBcAg y del HBsAg ocurra en tal forma que los antígenos obtenidos del plasma de pacientes con hepatitis B crónica (solo en el caso de HBsAg) mediante procesos sintéticos o mediante expresión recombinante se presentan en un portador farmacéutico adecuado. Este portador farmacéutico es preferiblemente un líquido, particularmente preferiblemente un líquido acuoso, todavía más preferiblemente una solución de sal acuosa, tal como PBS. Antes de poner en contacto con los otros componentes en la etapa de proceso IV), las soluciones de antígeno acuosas obtenidas en esta forma pueden ser filtradas estériles mediante los procesos conocidos por la persona experta.

Se prefiere de acuerdo con una realización preferida del proceso de acuerdo con la invención que la provisión del HBcAg y de HBsAg en las etapas de proceso I) y III) ocurra en tal forma que estos antígenos primero se presentan en un portador farmacéutico, preferiblemente en una solución de sal acuosa, en una concentración que es por lo menos doble, particularmente preferiblemente por lo menos tres veces, todavía más preferiblemente por lo menos cuatro veces y más preferiblemente por lo menos seis veces tan grande como la concentración del HBcAg o del HBsAg en la composición objetivo final de acuerdo con la invención (así, por ejemplo, la concentración de HBcAg en la cantidad de la composición de acuerdo con la invención debe ser 10 µg/ml, se prefiere en la composición que el HBcAg primero se proporciona en una solución de sal acuosa en una concentración de por lo menos 20 µg/ml, particularmente preferiblemente por lo menos 30 µg/ml, todavía más preferiblemente por lo menos 40 µg/ml y más preferiblemente por lo menos 60 µg/ml). Se prefiere presentar HBcAg y HBsAg en una y la misma solución de sal en las concentraciones mencionadas anteriormente (por lo menos dos veces, por lo menos tres veces, por lo menos cuatro veces o por lo menos seis veces sobre-concentrado). Se prefiere adicionalmente de acuerdo con la invención que estas soluciones de antígeno sobreconcentradas, antes de ponerlas en contacto con el adyuvante en la etapa de proceso IV), se incuban durante un periodo de 10 minutos a 4 horas, particularmente preferiblemente de 20 minutos a 2 horas y todavía más preferiblemente de 30 minutos a 1 hora a una temperatura dentro de un rango de 30 a 60 °C, particularmente preferiblemente 35 a 55 °C y todavía más preferiblemente 37 a 50 °C. Después de poner en contacto el antígeno con el adyuvante, se prefiere adicionalmente que la composición así obtenida se incube durante un periodo de 15 minutos a 5 horas, particularmente preferiblemente de 30 minutos a 3 horas y todavía más preferiblemente de 45 minutos a 2 horas a una temperatura de 10 a 40 °C, particularmente preferiblemente de 15 a 30 °C, todavía más preferiblemente de 20 a 25 °C y más preferiblemente a temperatura ambiente.

En la etapa de proceso II) se proporciona el adyuvante. También se prefiere aquí que el adyuvante, antes de ser puesto en contacto con los componentes I) o III), primero se esterilice, por ejemplo mediante filtración estéril, mientras el adyuvante utilizado no se puede obtener comercialmente aún en forma estéril.

40 En particular, si los complejos de saponina, esteroides y/o fosfolípidos utilizados como adyuvante (matriz ISCO®), se prefiere de acuerdo con la invención que, primero, los complejos se preparen en forma estéril o se pueden obtener comercialmente de proveedores apropiados y entonces el complejo de saponina o el derivado del complejo de saponina se ponen en contacto con la solución HBcAg acuosa, esterilizada y con la solución HBsAg esterilizada o con una mezcla de estas dos soluciones. En esta forma, la formación de un complejo ISCOM clásico, en el que se incorporan los antígenos en el interior de la matriz ISCO® (así llamados ISCOM) no ocurre.

Las composiciones así obtenidas luego se pueden combinar adicionalmente con aditivos adicionales, tales como, por ejemplo, portadores y aditivos farmacéuticos adicionales, dependiendo de si la composición se debe administrar oralmente, intranasalmente, intradérmicamente, subcutáneamente, intramuscularmente o intravenosamente. Como portador y aditivo farmacéutico, aquellos compuestos que a su vez se prefieren ya se han mencionado como portadores farmacéuticos preferidos y aditivos preferidos en relación con la composición de acuerdo con la invención.

Si se obtienen soluciones acuosas, estas se pueden empacar o liofilizar en estado estéril, acuoso, por lo que la composición liofilizada se combina con una solución estéril antes de administración.

Una contribución adicional para la solución el objeto mencionado anteriormente se proporciona por las composiciones que se pueden obtener mediante el proceso descrito anteriormente, por lo que estas composiciones tienen preferiblemente las mismas propiedades como la composición descrita anteriormente de acuerdo con la invención.

- 5 Una contribución a la solución de los objetos mencionados anteriormente también se proporciona por una formulación farmacéutica que comprende la composición de acuerdo con la invención así como también por lo menos uno de los aditivos mencionados anteriormente iv).

También se proporciona una contribución a la solución de los objetos mencionados anteriormente mediante el uso de la composición de acuerdo con la invención o de la formulación farmacéutica de acuerdo con la invención para 10 terapia y/o para profilaxis de las infecciones VHB y enfermedades mediadas por VHB. Preferiblemente, la composición de acuerdo con la invención o la formulación farmacéutica de acuerdo con la invención se utiliza para la administración en mamíferos, en particular humanos. De acuerdo con un uso preferido de la composición de acuerdo con la invención o de la formulación farmacéutica de acuerdo con la invención, esta sirve en particular para 15 terapia y/o para profilaxis, preferiblemente para terapia, de infecciones por VHB agudas y/o crónicas, preferiblemente crónicas.

El término "profilaxis" en el contexto de una infección por VHB en humanos comprende preferiblemente

- el tratamiento de un humano quien aún no está en contacto con VHB, con el propósito de evitar la 5 ocurrencia de una infección con VHB,
- el tratamiento de un humano quien aún no ha entrado en contacto con VHB y quien está en fase crónica inmunotolerante, con el objetivo de evitar que este humano entre en la fase crónica inactivo, así como también 20
- el tratamiento de un humano quien aún no ha entrado en contacto con VHB y que está en la etapa de portador inactivo, con el objetivo de evitar que esta persona entre nuevamente en la fase inactivo.

El término "terapia" en relación con una infección por VHB en humanos comprende preferiblemente

- el tratamiento de un humano quien aún no ha entrado en contacto con VHB y quien está en fase aguda de 25 la infección,
- el tratamiento de un humano quien aún no ha entrado en contacto con VHB y quien está en la fase crónica inactivo.

Particularmente preferiblemente, la composición de acuerdo con la invención o la formulación farmacéutica de acuerdo con la invención se administra a pacientes quienes ya se han infectado con VHB.

30 Las personas en la fase de infección aguda, en la fase crónica inmunotolerante, en la fase crónica inactivo o en la etapa de portador inactivo se puede tratar con la composición de acuerdo con la invención o con la formulación farmacéutica de acuerdo con la invención, separadamente o en combinación con otras terapias según sea necesario. En aplicaciones terapéuticas, la composición o la formulación farmacéutica respectivamente se 35 administran a un paciente en una cantidad que es suficiente con el fin de provocar una respuesta efectiva CTL contra los antígenos VHB y cura o por lo menos parcialmente detiene los síntomas y/o complicaciones asociadas con VHB. Si se utiliza respectivamente la composición de acuerdo con la invención o la formulación farmacéutica de acuerdo con la invención, como se prefiere particularmente, para terapia de hepatitis B crónica, el objetivo de la terapia es la reducción o, en el caso ideal, una eliminación de las células infectadas con el virus. Debido a que las 40 personas pueden desarrollar una hepatitis B crónica debido a una respuesta CTL inadecuada o carente durante la fase aguda de su infección, es importante proporcionar una cantidad de los antígenos víricos relevantes inmunes (HBcAg_{1-x} y HBsAg) en una composición de acuerdo con la invención o en la formulación farmacéutica de acuerdo con la invención respectivamente, que es suficiente con el fin de estimular efectivamente una respuesta CTL. Las cantidades con las cuales se logran estos propósitos se definen como "dosis terapéuticamente efectivas". La dosis que es terapéuticamente efectiva para facilidad de aplicación respectiva depende, por ejemplo, de la composición 45 exacta de la composición de acuerdo con la invención o de la formulación farmacéutica de acuerdo con la invención respectivamente, en el método de administración, en la etapa y la severidad de la enfermedad tratada, en el peso y el estado general de salud del paciente así como también en el juicio del médico tratante, pero de manera general se encuentra preferiblemente dentro de un rango de alrededor de 0.1 a 2,000 µg (cantidad total de adyuvantes, HBcAg_{1-x} y HBsAg) para un paciente que pesa 70 kg, particularmente preferiblemente dentro de un rango de 0.5 a 50 1,500 µg, todavía más preferiblemente dentro de un rango de 1 a 1,000 µg y más preferiblemente dentro de un rango de 10 a 500 µg, seguido por dosis renovadas dentro de un rango de 0.1 a 2,000 µg durante semanas a

meses, dependiendo de la respuesta CTL de un paciente, que se determina por la medición de la actividad CTL específica de VHB en los linfocitos de sangre periférica (PBL) del paciente.

5 En la terapia de hepatitis B crónica, la administración se debe continuar para una longitud de tiempo hasta por lo menos los síntomas clínicos o los indicadores de laboratorio que indican que la infección por VHB se ha eliminado o está por lo menos bajo el control del sistema inmune, opcionalmente por más tiempo.

La composición de acuerdo con la invención o la formulación farmacéutica de acuerdo con la invención, en principio, se puede administrar oralmente, intranasalmente, intradérmicamente, subcutáneamente, intramuscularmente o intravenosamente.

10 Se proporciona una contribución a la solución del objeto mencionado anteriormente, adicionalmente, mediante el uso de la composición de acuerdo con la invención para la producción de una formulación farmacéutica para terapia y/o profilaxis de infecciones por HHV y enfermedades mediadas por VHB.

En este contexto, se proporciona una contribución particular a la solución del objeto mencionado anteriormente mediante el uso de la composición de acuerdo con la invención, que comprende

i) el HBcAg_{1-x} descrito anteriormente,

15 ii) el adyuvante descrito anteriormente que comprende una saponina, así como también

iii) el HBsAg descrito anteriormente,

20 para la producción de una formulación farmacéutica para terapia de infecciones VHB y enfermedades mediadas por VHB, preferiblemente para terapia de infecciones VHB y enfermedades mediadas por VHB, por lo que las infecciones VHB o la enfermedad mediada por VHB se ha originado por un virus HB cuyo genotipo o subtipo, preferiblemente genotipo, difiere del genotipo o subtipo, preferiblemente genotipo, del HBsAg comprendido en la composición de acuerdo con la invención. Si, por ejemplo, la infección VHB o la enfermedad mediada por VHB se provoca por un virus HB del genotipo A, para la terapia de esta infección en esta enfermedad, preferiblemente se utiliza una composición de acuerdo con la invención que utiliza, además de los componentes i) y ii), un HBsAg del genotipo B, C, D, E, F, G o mezclas de HBsAg de estos genotipos, por lo que también se puede comprender un
25 HBsAg del genotipo A.

30 Adicionalmente, se hace una contribución a la solución de los objetos mencionados anteriormente mediante un proceso para terapia y/o para profilaxis de infecciones VHB y enfermedades mediadas por VHB, en las que un humano que aún no ha entrado en contacto con VHB o un humano quien aún no ha estado en contacto con VHB, preferiblemente un paciente que sufre de hepatitis B crónica, se administra una dosis terapéuticamente efectuada de la composición de acuerdo con la invención o de la formulación farmacéutica de acuerdo con la invención, preferiblemente en la técnica y forma descrita anteriormente.

35 También puede ser particularmente ventajoso aquí administrar a la persona quien aún no ha entrado en contacto con VHB, preferiblemente al paciente que sufre de hepatitis B crónica, tal composición que también comprende, además del HBcAg_{1-x} y el adyuvante, un HBsAg que se deriva de un genotipo VHB o el subtipo VHB, que difiere del genotipo o subtipo, preferiblemente el genotipo, del virus HB que es causal para infección por VHB o para la enfermedad mediada por VHB de la persona que se va a tratar.

La invención ahora se ilustra más cercanamente por medio de las figuras no limitantes y ejemplos.

La Figura 1 muestra las respuestas CTL cuando se utilizan las composiciones que no están de acuerdo con la invención con AbISCO®-100 como adyuvante.

40 La Figura 2 muestra las respuestas CTL cuando se utilizan las composiciones de acuerdo con la invención con AbISCO®-200 como adyuvante.

La Figure 3 muestra la respuesta de célula B cuando se utilizan las composiciones de acuerdo con la invención que comprenden HBcAg y HBsAg, con AbISCO®-200 como adyuvante, ilustrado mediante el conteo AUSAB-anti-HBsAg.

45 La Figura 4 muestra el perfil inmune de la respuesta de célula B cuando se utilizan las composiciones de acuerdo con la invención que comprenden HBcAg y HBsAg, con ABISCO®-200 como adyuvante, ilustrado mediante el conteo de anti-HBsAg-IgG1 y el isotipo anti- HBsAg-IgG2b. La composición de acuerdo con la invención induce las respuestas inmunes Th1 y Th2.

MÉTODOS

Inmunización de ratones C57BL/6

Se inmunizan ratones C57BL/6 con PBS, HBcAg, HBsAg y adyuvante en las cantidades dadas en las tablas 1 y 2 en respectivamente 100 μ l de PBS, por lo que las cantidades dadas respectivamente se inyectan respectivamente subcutáneamente dos veces en una separación de 21 días. Para la inmunización de ADN, el núcleo pCI/VHB_{ayw} de plásmido se inyecta en cantidades de 2 X 50 μ g en respectivamente 50 μ l de PBS en cada músculo tibial anterior.

Determinación de frecuencia de célula T CD8+ específica de antígeno en el bazo

Dos semanas después de la segunda inmunización, el bazo se retira de los animales y las suspensiones celulares se producen de las células del bazo. La producción de las suspensiones de célula de bazo se describe en Schirmbeck R., Böhm W., Fissolo N., Melber K., and Reimann J.: "Different immunogenicity of H-2 Kb-restricted epitopes in natural variants of the hepatitis B surface antigen", *Europ. J. Immunol.* 2003, 33: 2429-38. Las células del bazo se incuban (re-estimulación) durante cuatro horas en medio RPMI-1640 con 0.25 μ M del péptido específico de HBcAg (MGLKFRQL; Jerini BioTools, Berlin, DE) y 5 μ g/ml de Brefeldina A (BFA) (catálogo no. 15870, Sigma) a 37 °C. Las células re-estimuladas se cosechan y la superficie se colorea con mAb anti-CD8 (conjugado de anti-ratón CD8a-PE; catálogo no. 55303; BD Biosciences, Heidelberg, DE) fijo, se permeabiliza y se lleva a cabo una coloración en IFN γ citoplásmico (conjugado de anti-ratón IFN γ -FITC; catálogo no. 554411; BD-Biosciences, Heidelberg, DE). Las frecuencias de los CD8+IFN γ +CTL específicos de núcleo se determinan mediante análisis FACS. Se muestra el valor promedio para células T CD8+IFN γ + /10⁵ células T CD8+.

Determinación del isotipo de anticuerpo

Se recubren placas de microtítulo de 96 pozos (Nunc, Wiesbaden, DE) con el HBsAg (2 μ g/ml en regulador de carbonato) utilizado para inmunización durante la noche a 4 °C (100 μ L por pozo).

Al inicio del proceso ELISA, las placas recubiertas se lavan tres veces con PBST (solución salina regulada con fosfato con 0.5 % de Tween 20). Los pozos se bloquean con 0.2 % de gelatina durante 1 hora a 37 °C. Los plasmas/sueros de ratón que se van a determinar se diluyen en dos etapas en PBS (dentro del rango de 1:250 a 1:32,000) y respectivamente 100 μ L de las diluciones agregadas en los pozos apropiados (en duplicado y se incuban durante 1 hora a 37 °C. Se utiliza suero de ratones no inmunizados como control. La placa de microtítulo luego se lava cinco veces con PBST y se incuban con un segundo anticuerpo específico de isotipo (conjugado con peroxidasa). Para probar el IgG1, se utiliza gamlg1 (catálogo no. GAM/IgG1/PO) y para probar IgG2b, se utiliza gamlg2b (catálogo no. IgG2b/PO; Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Países Bajos). La reacción de color luego se lleva a cabo con o-fenilendiamina (oPD) (Sigma; catálogo no. P2903) como sustrato (1 mg/ml de oPD con 1 μ L/ml 30 % de H₂O₂) (100 μ L por pozo). La reacción de color se detiene después de 10-15 minutos por medio de 1 N H₂SO₄ (50 μ L por pozo) y la densidad óptica a 492 nm se mide en el espectrofotómetro (SpectraMax plus; Molecular Devices, Ismaning, DE).

Determinación del conteo total de anticuerpo anti-HBs

El conteo de anticuerpo anti-HBs en los sueros de ratones inmunizados se determina en el Analizador de Inmunoensayo Automático IMX (Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Alemania) utilizando el equipo de prueba IMX AUSAB® (no. referencia 2226-21, Abbott, Wiesbaden, Alemania). El ensayo se lleva a cabo como se describe por parte del fabricante.

Preparación de los antígenos

a) HBcAg₁₋₁₄₄₊

Por medio de la restricción BamHI, el plásmido pHB320 (7,543 pares base), que lleva el genoma completo VHB, se construye a partir del vector pBR322 (Bolívar F., Rodríguez R.L., Greene P.J., Betlach M.C., Heyneker H.L., Boyer H.W.: "Construction and Characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose Cloning System," *Gene.* 1977; 2(2):95-113) y el genoma del virus de hepatitis B circularizado (VHB320, 3,182 pares base; Bichko V, Pushko P, Dreilina D, Pumpens P, Gren E (1985), "Subtype ayw variant of hepatitis B virus", *FEBS* 185: 208-212).

Después de la restricción de HhaI y la descomposición de nucleasa S1 de las secuencias de hebra individual que sobresalen, se clona un fragmento largo de 1,000 pares base, que lleva las secuencias de gen para el gen pre-núcleo/núcleo (estructura de lectura abierta de núcleo) por medio de ligación de un extremo romo en el vector pBR322 P_{trp} (Ikehara M, Ohtsuka E, Tokunaga T. et al. (1984): Synthesis of a gene for human growth hormone and its expression in *E. coli.*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5956-5960). Este vector se ha cortado de antemano con

BamHI/ Sall y los extremos proyectados están llenos con polimerasa de ADN. El plásmido pGC74 resultante (6,046 pares base) lleva el promotor triptofán y el gen HBc en orientación opuesta. Esta orientación facilita las siguientes etapas de clonación mediante la reconstitución de sitios de restricción singulares para optimización del casete de expresión HBcAg.

5 Para cambiar la orientación de los fragmentos HBc, el pGC74 se restringe con BamHI, los extremos proyectados llenos con polimerasa de ADN y post-restringido con Sall. Este fragmento se liga con el vector pBR322 P_{trp}. Este vector se ha linearizado de antemano con Aval, los extremos se llenan con polimerasa de ADN y se restringen posteriormente con Sall. El plásmido así construido pGC2 (5,552 pares de bases) lleva el promotor de triptófano y el gen HBc en la misma orientación.

10 Este plásmido se restringe con Sall, los extremos proyectados retirados con nucleasa Bal31, se post-restringen con EcoRI, los extremos así resultantes que sobresalen se llena con polimerasa de ADN y se ligan de nuevo. Resulta así el plásmido pHbC10 (4,825 pares de bases) que resulta, con una secuencia acortada entre el promotor triptófano y el gen HBc para obtener una estructura o distancia óptima P_{trp}-Shine-Dalgarno-HBc.

15 Para la optimización de la expresión de gen, se digiere un fragmento HhaI-HBc de 1,044 pares base de pHbC10 después de la restricción con HhaI con nucleasa S1 y se clona en el vector pBR322- trp-I, un plásmido modificado pBR322. Esta construcción resulta en pHbC3 (7,108 pares base), con la secuencia optimizada del gen HBc bajo el control del promotor triptófano.

20 El plásmido pHbC3 se restringe con Kpn21 y un poliligador sintético EcoRV- ClaI- PvuI (5'TCCGGAGATATCGATCGTCCGGA- 3') incorporado en un sitio de restricción en la posición aminoácido 144 del gen HBc. El plásmido pHbC1615 (7,129 pares base) resulta de esto. El PHbC1615 se lineariza con ClaI y un poliligador sintético con un codón de terminación después de la posición de aminoácido 144 y con un codón isoleucina adicional en la posición 145 incorporada. Se obtiene el plásmido pHbC2-7.

25 Las células E. coli competentes (Cepa BL21: Genotipo B F-dcm ompT hsdS (rB -mB -)gal) se transforman con el plásmido pHbC2-7 y se obtienen después de poner en placas sobre LB Agar con ampicilina durante la noche a 37 °C. Con una colonia respectivamente individual, 300 ml de medio mínimo M9 (con la adición de 1 % de Casaminoácidos, Difco catálogo no. 223050, Becton-Dickinson, Heidelberg) y se inoculan 0.2 % de glucosa. El cultivo ocurre durante la noche a 37° C en un agitador redondo en un matraz Erlenmeyer de 1L. Los cultivos alcanzan de manera general una densidad óptica (OD_{540nm}) entre 2 y 5.

30 Las células se centrifugan y el glóbulo se re-suspende en regulador de lisis (50 mM TRIS/HCl pH 8.0; 5 mM EDTA, 100 µg/ml de PMSF, 0.08 % de Triton-X-100). Las células condicionadas luego se lisan en hielo por medio de tratamiento de ultrasonido (3 x 15 segundos a 22 kHz). Después de centrifugación de los residuos celulares, las proteínas se precipitan del sobrenadante con sulfato de amonio (33 % de saturación) durante 4-20 horas a 4 °C. El glóbulo se re-suspende en PBS con 0.1 % de Triton- X-100 y luego respectivamente 5-10 ml de la solución obtenida cargada en una columna de cromatografía de Sefarosa CL4B (2.5X85 cm). La elución ocurre con PBS sin la adición de Triton-X-100. La presencia de los polipéptidos HBcAg en las fracciones individuales se investiga por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida/coloración Coomassie. Se purifican las fracciones positivas y se concentran por medio de precipitación de sulfato de amonio (33 % de saturación) durante 20 horas at 4 °C. Los glóbulos de proteína se re-suspenden en PBS con una concentración entre 3-20 mg/ml y luego se dializan durante la noche contra 1,000 volúmenes del mismo regulador. El HBcAg₁₋₁₄₄₊ se filtra estéril en PBS y se almacena a -20 °C.

40 b) HBsAg

45 Se prepara el HBsAG como se describe en: Brocke P, Schaefer S., Melber K., Jenzelewski V., Müller F., Dahlems U., Bartelsen O., Park K.N., Janowicz Z.A., Gellissen G.: "Recombinant hepatitis B vacunas: disease characterization and vaccine production" (2005) en Gellissen G (Editor): "Production of recombinant proteins - novel microbial and eucaryontic expression systems", páginas 319-360, Wiley-VCH, Weinheim) y se puede obtener de Rhein Biotech, Düsseldorf, Alemania.

c) HBcAg₁₋₁₈₃

Se obtiene el HBcAG1-183 de DiaSorin S.r.l. (Saluggia, Italy).

EJEMPLO 1

50 En una primera serie de experimentos, el complejo de saponina que se puede obtener comercialmente bajo la descripción del producto AbISCO®-100 (ISCONOVA, Uppsala, Suecia) se utiliza como adyuvante. Se utiliza ADN de plásmido de núcleo como control positivo, PBS puro, adyuvante puro en PBS, HBc₁₋₁₄₄₊₁ puro en PBS así como

también HBc1-183 en PBS como control negativo. La composición de acuerdo con la invención comprende PBS, HBc1-144+I así como también AbISCO®-100. Las cantidades de los componentes individuales se dan en la tabla 1.

5 El plásmido de núcleo pCI/VHB_{ayw} se prepara como se describe en Kuhröber A., Pudollek H.P., Reifenberg K., Chisari F.V., Schlicht H.J., Reimann J., Schirmbeck R. (1996): "DNA Immunization induces antibody and cytotoxic T cell responses to hepatitis B core antigen in H-2b mice", J. Immunol. 156: 3687-95, (la construcción se denomina como pCMV- 1/c) y se aísla con QIAGEN-tip 500 (catálogo no. 12162; Qiagen, Hilden, Alemania) como se describe por el fabricante.

10 Para la formulación de la composición, el HBc_{1-144+I} primero se diluye con PBS cuatro veces la concentración del producto final y se incuba durante 30 minutos a 37 °C con agitación. Luego se agrega AbISCO®-100, como se suministra por el productor como dispersión acuosa, y la concentración final del antígeno que se da en la tabla 1 se ajusta con PBS, por lo que resulta la concentración dada en la tabla para el adyuvante y el antígeno. La composición así preparada se incuba durante una hora a temperatura ambiente (20-25 °C), luego se almacena durante la noche (12-18 horas) a 2-8 °C y se utiliza al siguiente día para inmunización.

Tabla 1

Grupo de ensayo	Composición utilizada para inmunización
A (n. inv. ¹⁾)	2 X 50 µg del ADN de plásmido de núcleo en 50 µl de PBS (control positivo)
B (n. inv.)	100 µl de PBS (control negativo)
C (n. inv.)	12 µg de AbISCO®-100 en 100 µl de PBS (control negativo)
D (n. inv.)	10 µg de HBcAg _{1-144+I} en 100 µl de PBS (control negativo)
E n. inv.	12 µg de AbISCO®-100 y 10 µg de HBcAg _{1-144+I} en 100 µl de PBS
1) n. inv. = no inventivo	

15

Las respuestas CTL logradas por la composición descrita anteriormente se pueden encontrar en la figura 1.

EJEMPLO 2

20 En una serie adicional de experimentos, el complejo de saponina que se puede obtener comercialmente bajo la descripción del producto AbISCO®-200 (ISCONOVA, Uppsala, Suecia) se utiliza como adyuvante. Como control positivo, se utiliza ADN de plásmido de núcleo; como PBS puro de control negativo, adyuvante puro en PBS, HBc_{1-144+I} puro en PBS y HBc₁₋₁₈₃ puro en PBS. La composición de acuerdo con la invención comprende PBS, HBc_{1-144+I} y AbISCO®-200 y HBsAg. Las cantidades de los componentes individuales se dan en la tabla 2.

25 Para la formulación de la composición de acuerdo con la invención, el HBc_{1-144+I}, y el HBsAg primero se diluye con PBS hasta cuatro veces la concentración del producto final y se incuba durante 30 minutos a 37 °C con agitación. Cuando se utiliza HBsAg, primero, se combinan HBsAg y HBcAg_{1-144+I} bajo condición aséptica y de forma similar se diluye con PBS hasta cuatro veces la concentración del producto final. Luego se agrega AbISCO®-200 en la forma de dispersión acuosa como se suministra por el fabricante, y la concentración final del antígeno como se da en la tabla 2 se ajusta con PBS, por lo que resulta la concentración dada en la tabla para el adyuvante y para el antígeno o los antígenos. La composición así producida se incuba durante una hora a temperatura ambiente (20-25 °C), luego se almacena durante la noche (12-18 horas) a 2-8 °C y se utiliza al siguiente día para inmunización.

30

Tabla 2

Grupo de ensayo	Composición utilizada para inmunización
F (n. inv.)	2 X 50 µg de ADN de plásmido de núcleo en 50 µl de PBS (control positivo)
G (n. inv.)	100 µl de PBS (control negativo)
H (n. inv.)	5 µg de AbISCO®-200 en 100 µl de PBS (control negativo)
I (n. inv.)	10 µg de HBcAg _{1-144+I} en 100 µl de PBS (control negativo)

ES 2 386 369 T3

(n. inv.)	10 µg de HBcAg ₁₋₁₄₄₊ y 5 de µg de HBsAg en 100 µl de PBS (control negativo)
K (n. inv.)	10 µg de HBcAg ₁₋₁₈₃ en 100 µl de PBS (control negativo)
L (n. inv.)	5 µg de AbISCO®-200 y 10 µl de HBcAg ₁₋₁₄₄₊ en 100 µl de PBS
M (inv.)	5 µg de AbISCO®-200, 10 µl de HBcAg ₁₋₁₄₄₊ y 5µg de HBsAg en 100 µl de PBS

Las respuestas CTL logradas por las composiciones descritas anteriormente se pueden tomar de la figura 2. Se puede ver a partir de esta figura que por medio de la composición de acuerdo con la invención (grupo de ensayo M) se pueden lograr respuestas CTL específicas de núcleo que son comparables con las respuestas CTL que se pueden lograr con el ADN de plásmido de núcleo (grupo de ensayo F).

La Figura 3 muestra que la composición de acuerdo con la invención, mientras también comprende HBsAg, también conduce a una respuesta de anticuerpo potente contra HBsAg. La Figura 4 muestra a su vez que por medio de tal composición de acuerdo con la invención, los conteos IgG1 así como también los conteos IgG2b se aumentan, que es indicador de la formación de una respuesta inmune Th1 y una respuesta inmune Th2.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Rhein Biotech Gesellschaft für neue biotechnologische Prozesse und Produkte mbH

<120> Una composición para terapia y/o profilaxis de infecciones por VHB y enfermedades mediadas por VHB

<130> RB82336PC

15 <150> EP2005020208.4

<151> 2005-09-16

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

20 <211> 8

<212> PRT

<213> polipéptido sintético

<400> 1

Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu
1 5

ES 2 386 369 T3

<210> 2

<211> 23

<212> ADN

<213> polinucleótido sintético

5 <400> 2

tccggagata tcgatcgtcc gga

23

REIVINDICACIONES

1. Una composición, que comprende:
 - i) un HBcAg_{1-x} (HBcAg = Antígeno del núcleo de hepatitis B), en donde x es un número entero del rango de 100 a 160, o una variante de este antígeno, en donde más de 5 aminoácidos del HBcAg_{1-x} se han eliminado, insertado, sustituido o adjuntado en los extremos del terminal C y/o N,
 - ii) un adyuvante que comprende una saponina, en donde el adyuvante es un complejo de saponina, y
 - iii) un HBsAg (HBsAg = Antígeno de superficie de hepatitis B) o una variante de este antígeno, en donde más de 5 aminoácidos del HBsAg se han eliminado, insertado, sustituido o adjuntado en los extremos.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde x es un número entero del rango de 140 a 149.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde x es un número entero del rango de 144 a 146.
4. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el adyuvante comprende componentes que son diferentes al agua o las soluciones salinas acuosas
 - (α1) 0 a 95 % en peso de un fosfolípido,
 - (α2) 0 a 95 % en peso de un esteroide,
 - (α3) 5 a 100 % en peso de la saponina o el derivado de saponina, y
 - (α4) 0 a 20 % en peso de aditivos adicionales,
 en donde las cantidades en peso se basan respectivamente en el peso total del complejo de saponina, con la excepción de su porción de agua o sus porciones de soluciones salinas acuosa y la suma de los componentes (α1) a (α4) es 100 % en peso.
5. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la relación de cantidad relativa entre los componentes de antígeno i) y iii) a adyuvante ii) subyace dentro de un rango de 1 : 20 a 20 : 1.
6. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la concentración total de los componentes i), ii) y iii) en la composición subyace dentro de un rango de 0.1 a 2,000 µg/ml.
7. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende
 - i) un HBcAg₁₋₁₄₅,
 - ii) un complejo de saponina, y
 - iii) un HBsAg.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende
 - i) un HBcAg₁₋₁₄₄₊₁,
 - ii) un complejo de saponina, y
 - iii) un HBsAg.
9. Un proceso para la preparación de una composición, que comprende las etapas del proceso I)-IV):

I) provisión de un HBcAg_{1-x}, en donde x es un número entero del rango de 100 a 160, o de una variante de este antígeno, en donde más de 5 aminoácidos del HBcAg_{1-x} se han eliminado, insertado, sustituido o adjuntado en los extremos de terminal C y/o N,

II) provisión de un adyuvante que comprende una saponina, en donde el adyuvante es un complejo de saponina,

5 III) provisión de un HBsAg o de una variante de este antígeno, en donde más de 5 aminoácidos del HBsAg se han eliminado, insertado, sustituido o adjuntado en los extremos, y

IV) poner en contacto del HBcAg_{1-x}, del adyuvante y del HBsAg.

10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde x es un número entero del rango de 140 a 149.

10 11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en donde x es un número entero del rango de 144 a 146.

12. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde el adyuvante comprende, como componentes que son diferentes al agua o las soluciones salinas acuosas

(α1) 0 a 95 % en peso de un fosfolípido,

(α2) 0 a 95 % en peso de un esteroide,

15 (α3) 5 a 100 % en peso de la saponina o el derivado de saponina, y

(α4) 0 a 20 % en peso aditivos adicionales, en donde las cantidades en peso se basan respectivamente en el peso total del complejo de saponina, con la excepción de su porción de agua o sus porciones de soluciones salinas acuosa y la suma de los componentes (α1) a (α4) es 100 % en peso.

20 13. Una composición que se puede obtener mediante un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12.

14. Una formulación farmacéutica, que comprende la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o 13 y aditivos adecuados.

25 15. El uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o 13 para la producción de una formulación farmacéutica para terapia y/o para profilaxis de infecciones VHB y enfermedades mediadas por VHB.

16. El uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o 13 para la preparación de una formulación farmacéutica para el tratamiento de infecciones VHB crónicas.

30 17. El uso de acuerdo con la reivindicación 15 o 16, en donde la infección VHB o la enfermedad mediada por VHB se ha originado por un virus HB cuyo genotipo o subtipo difiere del genotipo o subtipo del HBsAg comprendido en la composición.

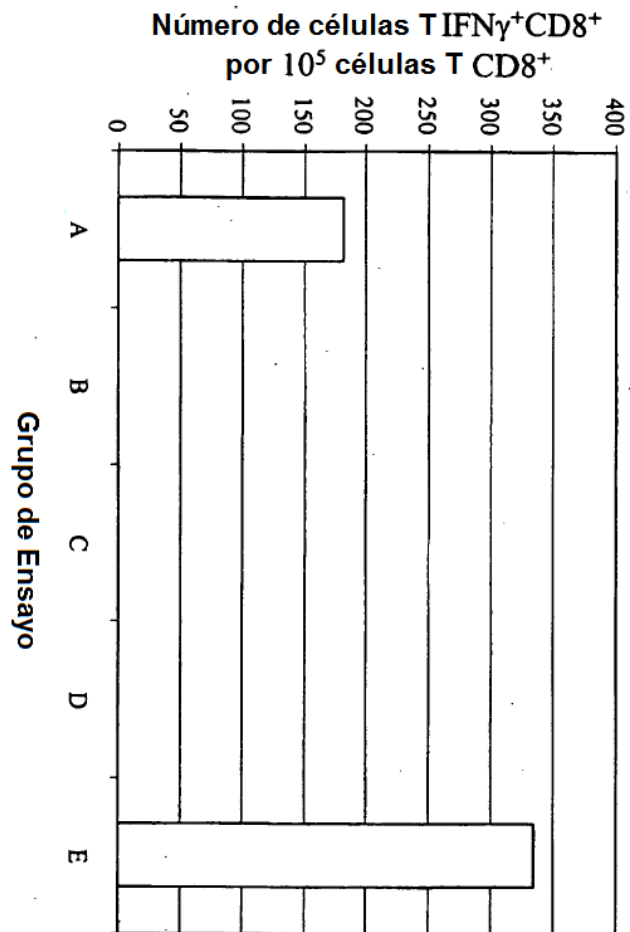


Fig. 1

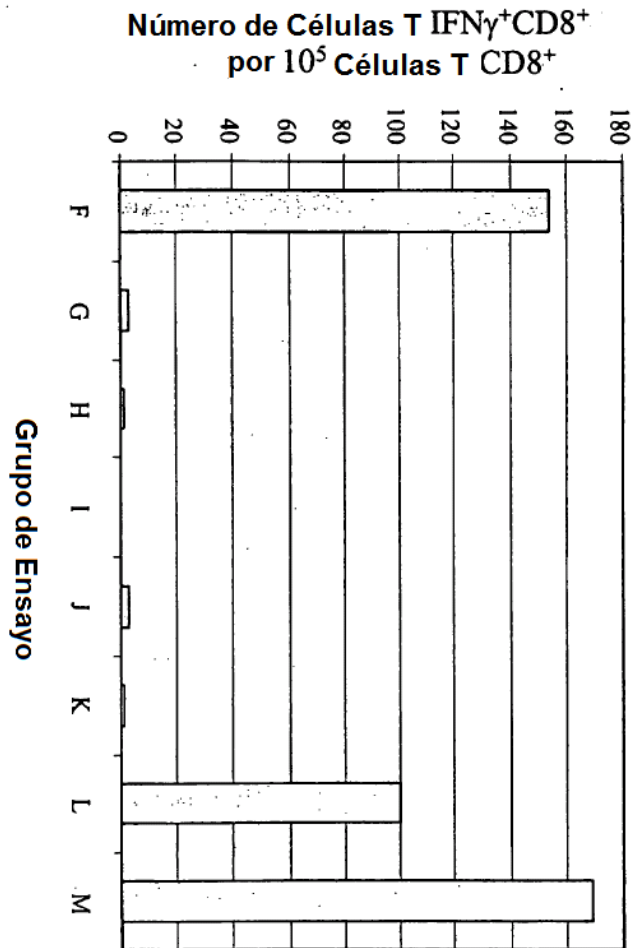


Fig. 2

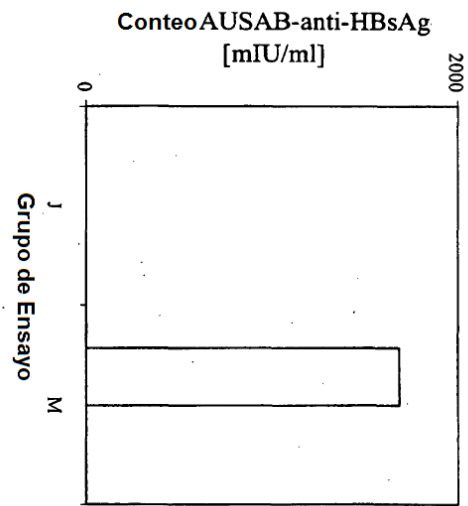


Fig. 3

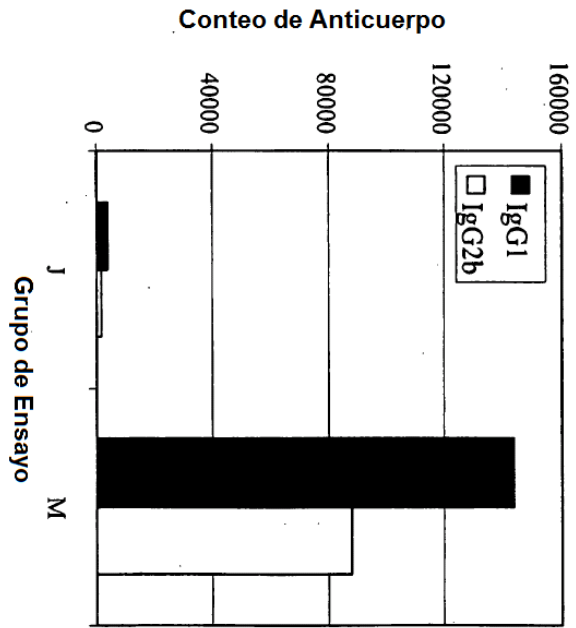


Fig. 4