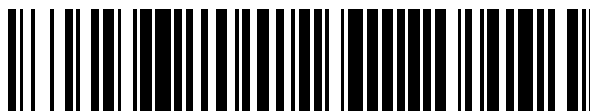


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 577**

51 Int. Cl.:

A61K 39/015 (2006.01)

A61K 39/29 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

C07K 14/445 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2006** **E 06762331 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014** **EP 1896060**

54 Título: **Vacunas contra la malaria**

30 Prioridad:

30.06.2005 GB 0513421

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

23.02.2015

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
Rue de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

COHEN, JOSEPH D.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 529 577 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 contra la malaria

La presente invención se refiere a un nuevo uso del antígeno de la malaria para inmunizar contra infección y enfermedad por malaria. La invención se refiere, en particular, al uso de antígenos esporozoítos, en particular proteína circumsporozoito (CS) o fragmentos inmunogénicos o derivados de la misma, combinados con adyuvantes adecuados, para inmunizar individuos sin tratamiento previo frente a la malaria que esperan viajar a regiones endémicas, contra infección por malaria.

La malaria es uno de los principales problemas de salud en el mundo. Durante el siglo 20, el desarrollo económico y social, junto con las campañas contra la malaria, han provocado la erradicación de la malaria de grandes áreas del mundo, reduciendo el área afectada de la superficie de la región terrestre del 50 % al 27 %. Sin embargo, dado el crecimiento de la población esperado se prevé que en 2010 la mitad de la población mundial, cerca de 3,5 mil millones de personas, estén viviendo en áreas en las que se transmite la malaria (Hay, 2004). Las estimaciones actuales sugieren que hay más de 1 millón de muertes debidas a la malaria cada año, y los costes económicos solo para África son abrumadores (Bremen, 2004).

Estas cifras ponen de relieve la crisis por malaria global y los problemas que tiene para la comunidad sanitaria internacional. Las razones de esta crisis son múltiples y varían desde la aparición de resistencia generalizada a fármacos disponibles, asequibles y previamente con alta eficacia, hasta el fracaso y deficiencia de sistemas sanitarios y la ausencia de recursos. A menos que se descubran medios para controlar esta enfermedad, fallarán los esfuerzos globales para mejorar la salud y supervivencia infantil, reducir la pobreza, aumentar la seguridad y reforzar las sociedades más vulnerables.

La malaria también tiene riesgos para los que viajan a o trabajan en regiones endémicas que normalmente viven en países libres de malaria. Los riesgos pueden ser superiores para esta población viajera, ya que no tienen ninguna inmunidad espontánea frente a la malaria de una exposición natural. Otro aspecto del riesgo adquirido por un viajero en una región endémica de malaria es que la enfermedad a menudo se diagnostica de forma incorrecta en sus fases tempranas debido a los síntomas tipo gripe. Cuando la gravedad aumenta y la malaria finalmente se diagnostica, puede ser demasiado tarde. A los pocos días de los síntomas en aumento, se puede producir la muerte, por ejemplo, por malaria cerebral, o a veces insuficiencia orgánica (por ejemplo, hígado o riñón).

Una de las formas más agudas de la enfermedad está causada por el parásito protozooario *Plasmodium falciparum* que es responsable de la mayoría de la mortalidad atribuible a la malaria. Otra forma de la enfermedad está causada por *Plasmodium vivax*. *P. vivax* es la más extendida de todas las malarias. Además de estar presente en regiones tropicales y subtropicales, la capacidad del parásito para completar su ciclo en mosquitos a temperaturas tan bajas como 15 grados Celsius, le ha permitido extenderse en climas templados. Sin embargo, debido al hecho de que la infección por *P. vivax* es raramente mortal, los esfuerzos para controlar la malaria por *P. vivax* (mediante el desarrollo de vacunas) están quedando por detrás de los de aquellos para *P. falciparum*.

Una observación hecha hace 30 años proporciona un fuerte apoyo para la creencia de que finalmente se desarrollará una vacuna eficaz contra la malaria. Los ratones y los seres humanos pueden protegerse contra la malaria por inmunización con esporozoítos de la malaria vivos, atenuados por radiación. La persistencia de una fase intrahepática *in vivo* es necesaria para producir y mantener una inmunidad protectora, pero los mecanismos subyacentes aún no se han definido completamente. Los anticuerpos, células T CD8 y CD4 (Hoffman, 1996) se han implicado como mediadores inmunes efectores críticos.

El ciclo de vida de *Plasmodium sp* (por ejemplo, *P. falciparum* o *P. vivax*) es complejo, requiriendo dos huéspedes, el hombre y el mosquito para completarlo. La infección del hombre se inicia por la inoculación de esporozoítos en la saliva de un mosquito infectado. Los esporozoítos migran al hígado y allí infectan los hepatocitos (fase del hígado) donde se diferencian, mediante la fase intracelular exoeritrocítica, en la fase merozoito que infecta glóbulos rojos (RBC) para iniciar la replicación cíclica en la fase sanguínea asexual. El ciclo se completa por la diferenciación de varios merozoítos en los RBC en gametocitos en fase sexual que el mosquito ingiere, donde se desarrollan a través de una serie de fases en el intestino medio para producir esporozoítos que migran a la glándula salivar.

La fase esporozoito de *Plasmodium sp* (por ejemplo, *P. falciparum* o *P. vivax*) se ha identificado como una diana potencial de una vacuna contra la malaria. La proteína de superficie principal del esporozoito se conoce como proteína circumsporozoito (proteína CS). Esta proteína se ha clonado, expresado y secuenciado para una diversidad de cepas, por ejemplo para *P. falciparum* la cepa NF54, clon 3D7 (Caspers, 1989). La proteína de la cepa 3D7 está caracterizada por tener una región repetida inmunodominante central que comprende un tetrapéptido Asn-Ala-Asn-Pro repetido 40 veces pero intercalada con cuatro repeticiones minoritarias del tetrapéptido Asn-Val-Asp-Pro. En otras cepas la cantidad de repeticiones mayoritarias y minoritarias varía así como su posición relativa. Esta porción central está flanqueada por una porción N y C-terminal compuesta por secuencias de aminoácidos no repetitivas denominadas como porción sin repeticiones de la proteína CS.

La vacuna contra la malaria RTS,S de GlaxoSmithKline Biologicals basada en la proteína CS ha estado en desarrollo desde 1987 y actualmente es la vacuna candidata contra la malaria más avanzada en estudio (Ballou, 2004). Esta vacuna tiene como diana específica la fase pre-eritrocítica de *P. falciparum*.

- 5 RTS,S/AS02A (RTS,S más adyuvante AS02A que contiene inmunoestimulantes QS21 y 3D-MPL en una emulsión de aceite en agua) se usó en estudios en Fase I consecutivos emprendidos en Gambia que implicó a adultos (Doherty, 1999) niños de edades 6-11 y 1-5 años (Bojang, 2001), que confirmó que la vacuna era segura, bien tolerada e inmunogénica. Posteriormente, se seleccionó una dosis de vacuna pediátrica y se estudió en un estudio en Fase I que implicó a niños mozambiqueños de edades 1-4 años donde se descubrió que era segura, bien tolerada e inmunogénica (Macete).
- 10 La vacuna RTS,S/AS02A también ha mostrado evidencias de eficacia en ensayos clínicos en los Estados Unidos y en el campo en África occidental. RTS,S/AS02A induce respuestas de anticuerpos IgG significativas contra la proteína circunsporozoíto de *P. falciparum* e inmunidad sustancial de células T (Lalvani, 1999; Sun, 2003). Se ha estimado que la eficacia contra una estimulación experimental con *P. falciparum* en voluntarios sin tratamiento previo frente a la malaria en los Estados Unidos es de aproximadamente el 30-50 % de media (Stoute, 1997; Stoute 1998; Kester, 2001).
- 15 El primero de estos estudios (Stoute, 1997) tuvo una eficacia del 86 % en un ensayo a pequeña escala en el que fueron protegidos 6 de 7 individuos inmunizados con RTS,S/AS02A. Además, un estudio de campo de adultos semi-inmunes en Gambia (precedido por un estudio de seguridad en adultos gambianos (Doherty, 1999)) mostró una eficacia global del 34 % en un periodo de una temporada de transmisión de 15 semanas, con una eficacia del 71 % en las primeras nueve semanas de seguimiento y una eficacia del 0 % después de ello (Bojang, 2001). Estos estudios (Stoute, 1997; Stoute, 1998; Bojang, 2001; Kester, 2001) muestran eficacia contra la infección.

- 20 Se presentaron recientemente resultados de un ensayo usando RTS,S/AS02A en niños africanos jóvenes. Se descubrió que la vacuna RTS,S basada en la proteína CS puede proporcionar no sólo protección contra infección en exposición natural sino también protección contra un amplio espectro de enfermedades clínicas causadas por *P. falciparum*. Los niños que recibieron la vacuna RTS,S experimentaron menos acontecimientos adversos graves, hospitalizaciones, y complicaciones graves por malaria, incluyendo muerte, que los del grupo de control (Alonso, 2004).

- Además, la eficacia de la vacuna RTS,S, tanto contra infecciones nuevas como episodios clínicos parece no disminuir o lo hace lentamente. Al final de los 6 meses de seguimiento en el ensayo, la vacuna permaneció eficaz ya que hubo una diferencia significativa en el predominio de la infección. Esto está en contra de ensayos previos en voluntarios sin tratamiento previo frente a la malaria o adultos gambianos que sugerían que la eficacia de la vacuna con RTS,S era de corta vida (Stoute, 1998; Bojang, 2001). Además, después de un periodo de seguimiento adicional de 12 meses, se observó que la eficacia de la vacuna no disminuía significativamente (Alonso, 2005).

- 30 RTS,S combinada con MPL y QS21 en una emulsión aceite en agua también se han ensayado en un régimen de administración de sensibilización-refuerzo. El documento WO2004/037189 describe un régimen de vacuna de sensibilización-refuerzo que implica sensibilizar con un vector de ADN que expresa proteína circunsporozoíto y reforzar con RTS,S combinada con MPL y QS21 en una emulsión de aceite en agua.

- Aunque la formulación de la vacuna descrita anteriormente muestra eficacia clínica, aún son necesarias mejoras adicionales para aumentar tanto la cantidad de individuos protegidos así como la persistencia de la protección. Nuevas formulaciones adyuvantes tales como una formulación que contiene QS21 y 3D-MPL en una formulación que contiene liposomas (mencionada en este documento como adyuvante B) ha demostrado una potencia superior para reforzar las respuestas inmunes de células T en diversas investigaciones preclínicas y clínicas.

- Aunque el documento EP0761231 describe la inmunogenicidad en ratones de partículas de RTS,S formuladas con QS21 y 3D-MPL, el documento WO96/33739 describe la inmunogenicidad en ratones de RTS,S, MPL y QS21 en una formulación de liposomas.

- 45 En particular, lo que se necesita para una vacuna para gente que no proceda de una región endémica de malaria pero que viaje durante un periodo limitado de tiempo a regiones en las que la malaria es endémica, es una mejor protección contra la infección. La manifestación clínica de la malaria sólo puede suceder si hay una infección productiva del hígado que conduce a la formación de merozoítos y su liberación de la fase hepática. Estos merozoítos pueden después infectar RBC e iniciar la fase sanguínea patogénica del parásito provocando la malaria sintomática clínica. Si no hay infección productiva después de la exposición (es decir, sin infección del hígado y/o sin liberación de merozoítos del hígado), entonces se conoce como inmunidad estéril. Una vacuna que redujera significativamente el riesgo de una infección productiva del hígado, como se ha definido anteriormente, después de la picadura del mosquito sería altamente deseable para una población viajera que no tiene inmunidad preexistente, porque previniendo la infección hepática productiva, la vacuna prevendría cualquier manifestación clínica posterior. Esto puede contrastarse con el objetivo de desarrollo de una vacuna dirigida a niños o gente de regiones endémicas, donde el objetivo principal sería disminuir la gravedad de la enfermedad y/o disminuir la cantidad de episodios de enfermedad, pero no necesariamente prevenirlos completamente. En teoría, no sería posible mantener indefinidamente la protección estéril en gente de regiones endémicas, y por lo tanto necesitan formar su propia inmunidad por exposición a la infección por malaria. Además, no es aconsejable otorgar protección estéril a gente de regiones endémicas durante un periodo limitado.

Los inventores presentes describen un ensayo clínico de estimulación que consta de una comparación mano a mano de RTS,S/AS02A frente a RTS,S con un adyuvante diferente (adyuvante B) que contiene QS21 y 3D-MPL en una formulación con liposomas que contienen colesterol, en una población virgen a la malaria (véanse los Ejemplos). Se investigó la inmunidad mediada tanto por células T como por células B.

- 5 Los resultados muestran que en una población adulta virgen a la malaria, el antígeno RTS,S en combinación con el adyuvante B es más del 50 % más eficaz en la protección contra infección hepática productiva después de una estimulación con la malaria, que RTS,S/AS02A. Por tanto, el antígeno RTS,S en combinación con el adyuvante B es más eficaz en términos de la protección estéril que es necesaria para individuos sin tratamiento previo frente a la malaria que viajan a regiones en las que la malaria es endémica. Esta mayor eficacia conferida por adyuvante B está asociada con una mayor respuesta inmunitaria específica del antígeno (anticuerpos y linfocitos T CD4-Th1).

- 10 Por lo tanto, la presente invención proporciona el uso de un antígeno de *Plasmodium* o un fragmento inmunogénico o derivado del mismo y un adyuvante que comprende un derivado de lípido A y una saponina en una formulación de liposoma, en la fabricación de un medicamento para inmunizar viajeros a regiones endémicas contra infección productiva por malaria, en el que el antígeno de *Plasmodium* es la proteína circunsporozoito (CS) o un fragmento inmunogénico o fragmentos inmunogénicos de la misma capaces de provocar una respuesta inmunitaria contra *Plasmodium* y en el que la proteína CS o fragmento de la misma está fusionada con el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg).

En líneas generales, los viajeros a regiones endémicas serán sin tratamiento previo frente a la malaria. Por tanto, la invención se aplica a individuos sin tratamiento previo frente a la malaria.

- 20 La invención se ocupa particularmente de reducir la incidencia de infecciones productivas por malaria en viajeros a regiones endémicas, que pueden tener cualquier edad pero en particular adultos.

- Un segundo aspecto de la invención proporciona una formulación que comprende un antígeno de *Plasmodium* o un fragmento inmunogénico o derivado del mismo y un adyuvante, que comprende 3D-MPL y QS21 en una formulación de liposoma, para su uso en la inmunización de viajeros a regiones endémicas contra infección productiva por malaria, en la que el antígeno de *Plasmodium* es la proteína circunsporozoito (CS) o un fragmento inmunogénico o fragmentos inmunogénicos de la misma capaces de provocar una respuesta inmunitaria contra *Plasmodium* y en el que la proteína CS o fragmento de la misma está fusionada con el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg).

- 25 Se describe en la presente memoria un procedimiento de profilaxis de infección productiva por malaria en viajeros a regiones endémicas que comprende la administración de cantidades adecuadas de una formulación que comprende un antígeno de *Plasmodium* o un fragmento inmunogénico o derivado del mismo y un adyuvante, que comprende un derivado de lípido A y una saponina en una formulación de liposoma.

En una realización de la invención, el antígeno de *Plasmodium* es un antígeno de *P. falciparum*. En otra realización de la invención, el antígeno de *Plasmodium* es un antígeno de *P. vivax*.

En la presente memoria se describe un antígeno pre-eritrocítico.

- 35 Por ejemplo, el antígeno puede seleccionarse entre cualquier antígeno que se exprese en la fase esporozoito u otra fase pre-eritrocítica del parásito tal como la fase del hígado. Por ejemplo, el antígeno puede seleccionarse entre la proteína circunsporozoito (CS), antígeno 1 de la fase del hígado (LSA-1) (véase, por ejemplo, el documento WO2004/044167), antígeno 3 de la fase del hígado (LSA-3) (descrito, por ejemplo, en los documentos EP 0 570 489 y EP 0 833 917), Pfs 16kD (descrita en los documentos WO 91/18922 y EP 597 843), el antígeno 1 Exportado (Exp-1) (descrito por ejemplo por Meraldi y col. 2002, Parasite Immunol vol 24 (3):141), la proteína del esporozoito rica en treonina y asparagina (STARP), el antígeno en fase esporozoito y del hígado (SALSA), proteína anónima relacionada con trombospondina (TRAP) (descrita en los documentos WO 90/01496, WO 91/11516 y WO 92/11868) y antígeno 1 de merozoito apical (AMA-1) (descrito en el documento EP 0 372 019) que ha mostrado recientemente que está presente en la fase del hígado (además de la fase eritrocítica). Todos estos antígenos son bien conocidos en el campo. El antígeno puede ser la proteína completa o un fragmento inmunogénico de la misma o un derivado de cualquiera de éstos. Los fragmentos inmunogénicos de antígenos de la malaria son bien conocidos, por ejemplo, el ectodominio de AMA-1 (descrito, por ejemplo, en el documento, por ejemplo, WO 02/077195). Los derivados incluyen, por ejemplo, fusiones con otras proteínas que pueden ser proteínas de la malaria o proteínas no de la malaria tales como HBsAg. Los derivados según la invención son capaces de provocar una respuesta inmunitaria contra el antígeno nativo.
- 40 El antígeno de *Plasmodium* puede fusionarse al antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg).

Un antígeno particular para su uso en la invención se obtiene de la proteína circunsporozoito (CS) y puede estar en forma de una proteína híbrida con HBsAg. El antígeno puede ser la proteína CS completa o parte de la misma, incluyendo un fragmento o fragmentos de la proteína CS, fragmentos que pueden fusionarse juntos.

- 55 El antígeno basado en proteína CS puede estar en forma de una proteína híbrida que comprende sustancialmente toda la porción C-terminal de la proteína CS de *Plasmodium*, cuatro o más repeticiones en tándem de la región inmunodominante de la proteína CS, y el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg). La proteína híbrida puede

comprender una secuencia que contiene al menos 160 aminoácidos y que es sustancialmente homóloga a la porción C-terminal de la proteína CS. En particular, "sustancialmente toda" la porción C-terminal de la proteína CS incluye el extremo C-terminal desprovisto de la secuencia de anclaje hidrófoba. La proteína CS puede estar desprovista de los últimos 12 aminoácidos del extremo C-terminal.

- 5 La proteína híbrida para su uso en la invención puede ser una proteína que comprenda una porción de la proteína CS de *P. falciparum* que corresponde sustancialmente a los aminoácidos 207-395 del clon 3D7 de *P. falciparum*, derivado de la cepa NF54 (Caspers, 1989) fusionado en fase mediante un engarce lineal al extremo N-terminal de HBsAg. El engarce puede comprender una porción de preS2 de HBsAg.

Las construcciones de CS para su uso en la presente invención son como se exponen en el documento WO 93/10152. Una construcción particular es la proteína híbrida conocida como RTS como se describe en el documento WO 93/10152 (donde se indica como RTS*) y el documento WO 98/05355.

Una proteína híbrida particular para su uso en la invención es la proteína híbrida conocida como RTS que consiste en:

- Un resto de metionina, codificado por los nucleótidos 1059 a 1061, derivado de la secuencia del gen TDH3 de Saccharomyces cerevisiae. (Musti, 1983).
- 15 • Tres aminoácidos, Met Ala Pro, derivados de una secuencia de nucleótidos (1062 a 1070) creada por el procedimiento de clonación usado para construir el gen híbrido.
- Un tramo de 189 aminoácidos, codificado por los nucleótidos 1071 a 1637 que representa los aminoácidos 207 a 395 de la proteína circumsporozoito (CSP) de la cepa 3D7 de *Plasmodium falciparum* (Caspers, 1989).
- 20 • Un aminoácido (Gly) codificado por los nucleótidos 1638 a 1640, creado por el procedimiento de clonación usado para construir el gen híbrido.
- Cuatro aminoácidos, Pro Val Thr Asn, codificados por los nucleótidos 1641 a 1652, y que representan los cuatro restos carboxi terminales de la proteína preS2 del virus de la hepatitis B (serotipo adw) (Valenzuela, 1979).
- Un tramo de 226 aminoácidos, codificado por los nucleótidos 1653 a 2330, y que especifica la proteína S del virus de la hepatitis B (serotipo adw).
- 25 La RTS puede estar en forma de partículas mixtas RTS,S.

Las partículas RTS,S comprenden dos polipéptidos RTS y S que pueden sintetizarse simultáneamente y forman espontáneamente estructuras en partículas compuestas (RTS,S), por ejemplo, durante la purificación.

- La proteína RTS puede expresarse en levaduras, por ejemplo *S. cerevisiae*. En dicho huésped, RTS se expresará en forma de partículas lipoproteicas. La cepa de levaduras receptora puede ya llevar en su genoma varias copias integradas de un módulo de expresión S de la hepatitis B. La cepa resultante sintetiza, por lo tanto, dos polipéptidos, S y RTS, que se ensamblan juntas espontáneamente en partículas lipoproteicas mixtas (RTS,S). Estas partículas pueden presentar las secuencias de CSP del híbrido en su superficie. La RTS y S en estas partículas mixtas pueden presentarse en una proporción particular, por ejemplo 1:4.

- 35 El uso de un antígeno de la malaria adicional o fragmento o derivado del mismo en la invención también se incluye en la invención. Otros antígenos pre-eritrocíticos tales como AMA-1, LSA-1, LSA-3 (descritos, por ejemplo, en los documentos EP 0 570 489 y EP 0 833 917) y Pfs 16kD, pueden usarse en combinación con RTS,S. Como alternativa, RTS,S puede usarse en combinación con un antígeno de fase sanguínea tal como la proteína 1 superficial de merozoito (MSP-1) (descrita, por ejemplo, en el documento US 4.837.016), el antígeno 175 de unión a eritrocitos (EBA-175) o MSP-3 (descrita por ejemplo, en el documento EP 0666916).

- 40 Los fragmentos inmunogénicos de cualquiera de los antígenos descritos en este documento contendrán al menos un epítipo del antígeno y presentarán antigenicidad de malaria y serán capaces de provocar una respuesta inmunitaria cuando se presentan en una construcción adecuada, tal como, por ejemplo, cuando están fusionados con otros antígenos de la malaria u otros antígenos no de la malaria, o se presentan en un vehículo, estando dirigida la respuesta inmunitaria contra el antígeno nativo. De forma típica, los fragmentos inmunogénicos contienen al menos 20, o al menos 45 50, o al menos 100 aminoácidos contiguos del antígeno de la malaria.

- Los derivados de los antígenos o fragmentos descritos en este documento contendrán de forma similar al menos un epítipo del antígeno y presentarán antigenicidad de malaria y serán capaces de provocar una respuesta inmunitaria, estando dirigida la respuesta inmunitaria contra el antígeno nativo. Los derivados incluyen, por ejemplo, fusiones del antígeno de la malaria a otra proteína que puede ser o puede no ser otra proteína de la malaria y puede ser, por ejemplo, HBsAg.

Según la invención, puede usarse directamente una solución acuosa de la proteína híbrida purificada y combinarse con el adyuvante adecuado según la invención. Como alternativa, la proteína puede liofilizarse antes de mezclarse con el

adyuvante. El adyuvante puede ser un líquido y por tanto se usa para reconstituir el antígeno en una forma de vacuna líquida.

Así, la invención proporciona adicionalmente el uso de un antígeno de *Plasmodium* o un fragmento inmunogénico o derivado del mismo y un adyuvante que comprende 3D-MPL y QS21 en una formulación de liposoma, como se describe en este documento, en la fabricación de un kit para inmunizar viajeros a regiones endémicas contra infección por malaria, donde el antígeno se proporciona en forma liofilizada y el antígeno y el adyuvante se mezclan antes de la administración, en la que el antígeno de *Plasmodium* es la proteína circumsporozoito (CS) o un fragmento inmunogénico o fragmentos inmunogénicos de la misma capaces de provocar una respuesta inmunitaria contra *Plasmodium* y en el que la proteína CS o fragmento de la misma está fusionada con el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg).

La dosis de vacuna según la invención puede estar entre 1-100 µg de RTS,S por dosis, por ejemplo 25 a 75 µg de RTS,S, por ejemplo una dosis de 50 µg de proteína RTS,S, que puede presentarse en 500 µl (formulación líquida final). Esta es una dosis adecuada para su uso en adultos. Una dosis adecuada para su uso en niños es la mitad de la dosis para adultos, que es 25 µg de RTS,S, que puede presentarse en 250 µl (formulación líquida final). Pueden usarse dosis similares para otros antígenos.

El antígeno se combina con un adyuvante que comprende un derivado de lípido A y una saponina en una formulación de liposoma.

Los adyuvantes adecuados según la invención son lípido A destoxificado de cualquier fuente y derivados no tóxicos de lípido A, que son estimuladores con preferencia de una respuesta de células Th1 (también llamada en este documento una respuesta de tipo Th1).

Una respuesta inmunitaria puede dividirse ampliamente en dos categorías extremas, que son una respuesta inmunitaria humoral o mediada por células (tradicionalmente caracterizadas por mecanismos de protección con anticuerpos y células efectoras respectivamente). Estas categorías de respuesta se han denominado respuestas de tipo Th1 (respuesta mediada por células), y respuestas inmunes de tipo Th2 (respuesta humoral).

Las respuestas inmunes de tipo Th1 extremas pueden caracterizarse por la generación de linfocitos T citotóxicos restringidos por haplotipo, específicos de antígeno, y respuestas de células citotóxicas naturales. En ratones, las respuestas de tipo Th1 a menudo se caracterizan por la generación de anticuerpos del subtipo IgG2a, mientras que en seres humanos éstos corresponden a los anticuerpos de tipo IgG1. Las respuestas inmunes de tipo Th2 están caracterizadas por la generación de un intervalo de isotipos de inmunoglobulinas incluyendo IgG1 en ratones.

Puede considerarse que la fuerza impulsora detrás del desarrollo de estos dos tipos de respuestas inmunes son citocinas. Altos niveles de citocinas de tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes mediadas por células contra el antígeno dado, mientras que altos niveles de citocinas de tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales contra el antígeno.

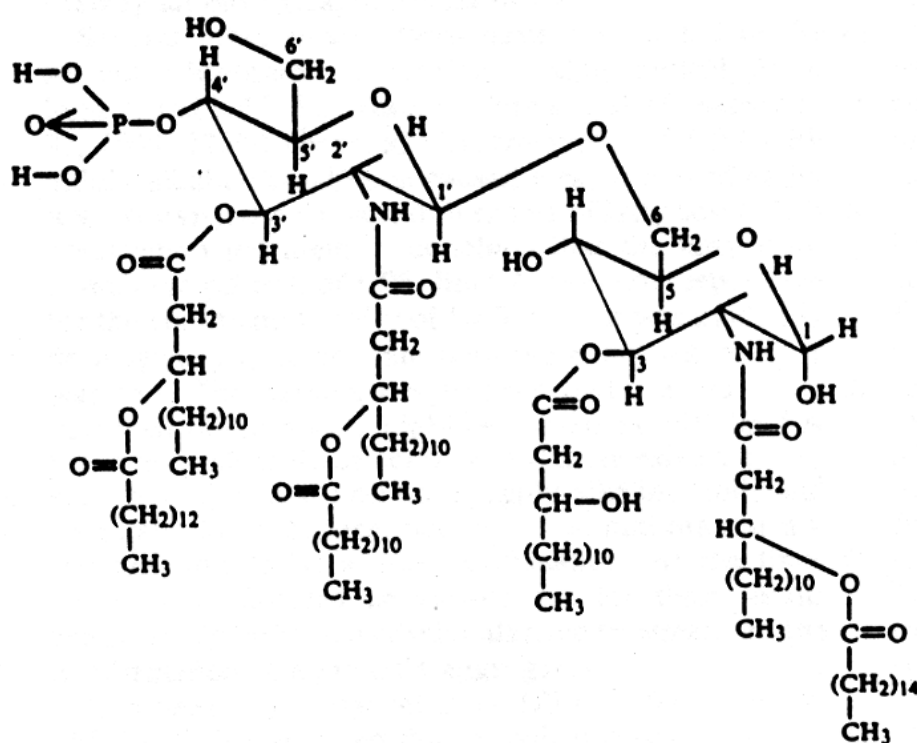
La distinción de respuestas inmunes de tipo Th1 y Th2 no es absoluta, y pueden adoptar la forma de continuidad entre estos dos extremos. En realidad, un individuo soportará una respuesta inmunitaria que se describe como predominantemente Th1 o predominantemente Th2. Sin embargo, a menudo es conveniente considerar las familias de citocinas en términos de lo descrito sobre clones de células T CD4⁺vas murinos por Mosmann and Coffman (Mosmann, 1989). Tradicionalmente, las respuestas de tipo Th1 están asociadas con la producción de las citocinas INF-gamma por linfocitos T. Otras citocinas a menudo directamente asociadas con la inducción de respuestas inmunes de tipo Th1 no están producidas por células T, tales como IL-12. Por el contrario, las respuestas de tipo Th2 están asociadas con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y factor de necrosis tumoral beta (TNF-beta).

Se sabe que ciertos adyuvantes de vacuna son particularmente adecuados para la estimulación de respuestas de citocinas de tipo Th1 o Th2. Tradicionalmente, los indicadores del equilibrio Th1:Th2 de la respuesta inmunitaria después de una vacunación o infección incluyen la medición directa de la producción de citocinas Th1 o Th2 por linfocitos T *in vitro* después de la re-estimulación con antígeno, y/o la medición (al menos en ratones) de la proporción IgG1:IgG2a de respuestas de anticuerpos específicos de antígeno.

Así, un adyuvante de tipo Th1 es uno que estimule poblaciones de células T aisladas para producir altos niveles de citocinas de tipo Th1 cuando se reestiman con antígeno *in vitro*, e induce respuestas de inmunoglobulinas específicas de antígeno asociadas con el isotipo de tipo Th1.

Los adyuvantes que son capaces de una estimulación con preferencia de la respuesta de células Th1 se describen en los documentos WO 94/00153 y WO 95/17209.

Se sabe desde hace tiempo que el lipopolisacárido enterobacteriano (LPS) es un potente estimulador del sistema inmunitario, aunque su uso en adyuvantes se ha restringido por sus efectos tóxicos. Se ha descrito (Ribi, 1986) un derivado no tóxico de LPS, monofosforil lípido A (MPL), producido por la retirada del grupo carbohidrato central y el fosfato del extremo reductor glucosamina, y tiene la siguiente estructura:



Otra versión destoxificada de MPL es el resultado de la retirada de la cadena acilo de la posición 3 del esqueleto disacárido, y se llama monofosforil lípido A 3-O-desacilado (3D-MPL). Puede purificarse y prepararse por los procedimientos mostrados en el documento GB 2122204B, referencia que también describe la preparación de difosforil lípido A, y variantes 3-O-desaciladas del mismo.

Una forma particular de 3D-MPL para su uso en la presente invención es en forma de una emulsión que tiene un tamaño de partícula pequeño inferior a 0,2 μm de diámetro, y su procedimiento de fabricación se describe en el documento WO 94/21292. Se han descrito en el documento WO98/43670 formulaciones acuosas que comprenden monofosforil lípido A y un tensioactivo.

Los adyuvantes derivados del lipopolisacárido bacteriano a usar en la presente invención pueden purificarse y procesarse a partir de fuentes bacterianas, o como alternativa pueden ser sintéticos. Por ejemplo, monofosforil lípido A purificado se describe en Ribí y col. (Ribí, 1986), y monofosforil o difosforil lípido A 3-O-desacilado derivado de *Salmonella* sp. se describe en el documento GB 2220211 y el documento US 4912094. Se han descrito otros lipopolisacáridos purificados y sintéticos (Hilgers, 1986; Hilgers, 1987; documento EP 0 549 074 B1). Un adyuvante de lipopolisacárido bacteriano particular para su uso en la invención es 3D-MPL.

Por consiguiente, los derivados de LPS que pueden usarse en la presente invención son los inmunoestimulantes que son similares en estructura a la de LPS o MPL o 3D-MPL. En otra alternativa, los derivados de LPS pueden ser un monosacárido acilado, que es una sub-porción de la estructura anterior de MPL.

Las saponinas también son inmunoestimulantes de Th1. Las saponinas son adyuvantes bien conocidos (Lacaille-Dubois, 1996). Las saponinas adecuadas para su uso en la invención incluyen saponinas inmunológicamente activas, por ejemplo Quil A (obtenida de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina de América del Sur), y fracciones inmunológicamente activas de la misma, como se describe en el documento US 5.057.540 y "Saponins as vaccine adjuvants" (Kensil, 1996) y el documento EP 0 362 279 B1. Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones purificadas por HPLC de Quil A) se han descrito como adyuvantes sistémicos potentes, y el procedimiento para su producción se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.057.540 y documento EP 0 362 279 B1. También se describe en estas referencias el uso de QS7 (una fracción no hemolítica de Quil-A) que funciona como adyuvante potente para vacunas sistémicas. El uso de QS21 se describe adicionalmente en Kensil y col. (Kensil, 1991). También se conocen combinaciones de QS21 y polisorbato o ciclodextrina (documento WO 99/10008). Se describen sistemas adyuvantes particulares que comprenden fracciones de QuilA, tales como QS21 y QS7 en el documento WO 96/33739 y el documento WO 96/11711.

El lipopolisacárido y los inmunoestimulantes de saponina descritos anteriormente para su uso en la invención se formulan junto con un vehículo de liposomas. Por ejemplo, el vehículo puede comprender liposomas que contienen colesterol como se describe en el documento WO 96/33739.

Se describen combinaciones de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina en los documentos WO 94/00153; WO 95/17210; WO 96/33739; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241, y la combinación de QS21 y 3D-MPL se divulga en el documento WO 94/00153.

5 Así, los sistemas adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen, por ejemplo, una combinación de un monofosforil lípido A, tal como 3D-MPL, junto con un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se divulga en el documento WO 94/00153. El sistema adyuvante incluye un vehículo de liposomas, por ejemplo liposomas que contienen colesterol, por ejemplo en una composición en la que QS21 está inactivado en liposomas que contienen colesterol (DQ) como se describe en el documento WO 96/33739.

10 Así, la saponina tal como QS21 también puede estar presente en o estar asociada con las membranas de los liposomas, como se describe en el documento WO 96/33739. El 3D-MPL u otro derivado de lípido A puede estar presente inmovilizado en la membrana de los liposomas, o por fuera de los liposomas, o ambos. Un adyuvante particular para su uso en la invención comprende los dos inmunoestimulantes QS21 y 3D-MPL, en una formulación con liposomas que contienen colesterol, en la que el 3D-MPL está inmovilizado en los liposomas y el QS21 está asociado con los liposomas.

15 La cantidad de la proteína de la presente invención presente en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en vacunas típicas. Dicha cantidad variará dependiendo del inmunógeno específico y adyuvante específico que se empleen. Generalmente, se espera que cada dosis comprenda 1-1000 µg de proteína, por ejemplo 1-200 µg, por ejemplo 10-100 µg. Una cantidad óptima para una vacuna particular puede determinarse por estudios convencionales que implican la observación de
20 títulos de anticuerpos y otras respuestas en sujetos.

Un programa de vacunación adecuado para su uso con la invención es un curso principal antes de viajar a una región endémica de malaria que puede completarse por ejemplo al menos 2-4 semanas antes de la llegada a la región. Este curso principal puede implicar entre 1 y 3 dosis, por ejemplo 2 o 3 dosis, administradas con un intervalo de al menos 7 días, o entre 1 y 4 semanas, o por ejemplo un mes entre las dosis. Un curso de vacunación principal puede venir
25 seguido por refuerzos repetidos cada seis meses mientras exista un riesgo de infección. Después pueden ser apropiadas vacunaciones de refuerzo periódicas antes de repetir el viaje a las regiones endémicas. Las cantidades adecuadas de proteína RTS,S por dosis son las que se han dado en este documento anteriormente.

Las vacunas de la invención pueden administrarse por cualquiera de una diversidad de vías tales como oral, tópica, subcutánea, en la mucosa (de forma típica intravaginal), intravenosa, intramuscular, intranasal, sublingual, intradérmica
30 o por supositorio.

La invención puede usarse adicionalmente en un régimen de sensibilización-refuerzo heterólogo.

En lugar de, o además de dosis repetidas de la composición que contiene RTS,S u otro polipéptido, puede administrarse una forma diferente de la vacuna en un régimen de vacunación "sensibilización-refuerzo" heterólogo. La composición de
35 sensibilización y la composición de refuerzo tendrán al menos un antígeno en común, aunque no necesariamente una forma idéntica del antígeno; y puede ser una forma diferente del mismo antígeno.

Las inmunizaciones de sensibilización-refuerzo según la invención pueden realizarse de acuerdo con una combinación de proteína y polinucleótido, particularmente formulaciones basadas en ADN. Dicha estrategia se considera eficaz para inducir respuestas inmunes amplias. Las vacunas proteicas potenciadas con adyuvante inducen principalmente
40 respuestas inmunes de anticuerpos y linfocitos T auxiliares, mientras que el suministro de ADN en forma de plásmido o un vector vivo induce fuertes respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL). Por tanto, la combinación de una vacunación proteica y de ADN proporcionará una amplia diversidad de respuestas inmunes.

Por tanto, la invención proporciona adicionalmente el uso de un antígeno de *Plasmodium* o un fragmento inmunogénico o derivado del mismo y un adyuvante que comprende un derivado de lípido A y una saponina en una formulación de liposoma, como se describe en este documento, junto con un polinucleótido que codifica el antígeno de *Plasmodium* o
45 un fragmento inmunogénico o derivado del mismo, en la fabricación de un kit farmacéutico para inmunizar viajeros a regiones endémicas contra infección productiva por malaria.

En la presente memoria se describe un kit que comprende:

- un antígeno de *Plasmodium* o un fragmento inmunogénico o derivado del mismo proporcionado en forma liofilizada,
- un adyuvante que comprende 3D-MPL y QS21 en una formulación de liposoma, y
- 50 • instrucciones que especifican que el antígeno, adyuvante, y opcionalmente un vehículo adicional, tienen que mezclarse antes de la administración a un viajero a una región endémica,

protegiendo de este modo a dicho viajero contra infección productiva por malaria, en la que el antígeno de *Plasmodium* es la proteína circunsporozoíto (CS) o un fragmento inmunogénico o derivados de la misma capaces de provocar una

respuesta inmunitaria contra *Plasmodium* y en el que la proteína CS o fragmento de la misma está fusionada con el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg).

Así, cuando se usa RTS,S u otro polipéptido basado en la proteína CS como componente polipeptídico de un régimen de sensibilización-refuerzo, el componente polinucleotídico codificará la proteína CS o un fragmento inmunogénico o derivado de la misma.

El ADN puede suministrarse como ADN desnudo tal como ADN plasmídico, o en forma de un vector vivo recombinante. Los vectores vivos para su uso en la invención pueden ser deficientes en la replicación. Ejemplos de vectores vivos que pueden usarse son vectores de poxvirus que incluyen vectores de poxvirus modificados, por ejemplo Virus Ankara Modificado (MVA), vectores de alfavirus, por ejemplo vectores del virus de la Encefalitis Equina Venezolana, o vectores de adenovirus por ejemplo un vector de adenovirus no humano tal como un vector de adenovirus de chimpancés, o cualquier otro vector vivo adecuado.

Un adenovirus adecuado para su uso como vector vivo en una vacuna de sensibilización-refuerzo según la invención es un adenovirus de seres humanos con baja seroprevalencia tal como Ad5 o Ad35 o un adenovirus de origen no humano tal como un adenovirus de primate no humano tal como un adenovirus de simio. Los vectores pueden ser deficientes en la replicación. De forma típica, estos virus contienen una delección en E1 y pueden crecer en líneas celulares que están transformadas con un gen de E1. Los adenovirus de simio adecuados son virus aislados de chimpancés. En particular, pueden usarse C68 (también conocido como Pan 9) (Véase la Patente de Estados Unidos Nº 6 083 716) y Pan 5, 6 y Pan 7 (documento WO 03/046124). Estos vectores pueden manipularse para insertar un polinucleótido heterólogo de modo que puedan expresarse los polipéptidos. El uso, formulación y fabricación de dichos vectores adenovirales recombinantes se describen con detalle en el documento WO 03/046142.

Pueden inyectarse antígenos proteicos una vez o varias veces seguido por una o más administraciones de ADN, o puede usarse ADN primero para una o más administraciones seguido por una o más inmunizaciones con proteínas. Puede ser beneficioso administrar primero el ADN, seguido por la proteína.

Así, un ejemplo particular de inmunización sensibilización-refuerzo implica sensibilizar con una única dosis de un polinucleótido en forma de un vector vivo recombinante tal como cualquiera de los descritos anteriormente, seguido por refuerzo con una o más dosis, por ejemplo 2 o 3 dosis, de la proteína potenciada tal como RTS,S con un adyuvante descrito en la presente memoria. El polinucleótido codifica la misma proteína (por ejemplo, proteína CS) o un fragmento inmunogénico o derivado de la misma.

Así, la presente memoria proporciona un kit farmacéutico que comprende

a) un antígeno de *Plasmodium* o un fragmento inmunogénico o derivado del mismo y un adyuvante que comprende un derivado de lípido A y una saponina en una formulación de liposoma, y

b) un polinucleótido que codifica el antígeno de *Plasmodium* o un fragmento inmunogénico o derivado del mismo;

en el que a) y b) son para su uso secuencial en cualquier orden, pero particularmente en el que b) se usa como la sensibilización y a) se usa como el refuerzo. También se describen instrucciones con dicho kit, que especifican que, con respecto a a), el antígeno, adyuvante, y opcionalmente un vehículo adicional, tienen que mezclarse antes de la administración a un viajero a una región endémica.

La composición a) puede ser cualquier composición polipeptídica como se describe en este documento, en un adyuvante adecuado como se describe en este documento. Por ejemplo a) puede ser una composición que comprende RTS,S y un adyuvante que comprende QS21 y 3D-MPL en una formulación de liposoma, y b) puede ser un vector vivo como se describe en este documento tal como un vector de adenovirus, por ejemplo, un vector de adenovirus de chimpancés, que codifica la proteína CS o un fragmento inmunogénico o derivado de la misma.

Tanto la composición de sensibilización como la composición de refuerzo pueden suministrarse en más de una dosis. Además, las dosis de sensibilización inicial y refuerzo pueden venir seguidas por dosis adicionales que pueden alternarse para producir, por ejemplo, una sensibilización con ADN / refuerzo con proteínas / dosis adicional de ADN / dosis adicional de proteínas.

Los diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados para su uso en la invención son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, agua o tampones. La preparación de la vacuna está descrita en líneas generales (Powell, 1995; Voller, 1978). La encapsulación en liposomas está divulgada, por ejemplo, por Fullerton, patente de Estados Unidos 4.235.877. La conjugación de proteínas a macromoléculas se divulga, por ejemplo, por Likhite, patente de Estados Unidos 4.372.945 y por Armor y col., patente de Estados Unidos 4.474.757.

Se describe en el presente documento un procedimiento para determinar si un individuo está protegido contra la malaria después de la administración de una composición de antígeno de la malaria al individuo, procedimiento que comprende medir el nivel de células T CD4 producidas en el individuo específicas para el antígeno de la malaria. Además, se proporciona un procedimiento para evaluar si un individuo está protegido contra la malaria después de la administración de una composición de antígeno de la malaria, en particular una composición de antígeno de la malaria pre-eritrocítico,

al individuo, procedimiento que comprende medir la concentración de anticuerpos producidos en el individuo específicos para el antígeno de la malaria.

- Se describe además un procedimiento para determinar la eficacia de una vacuna candidata, en particular, una vacuna candidata pre-eritrocítica, en la prevención de la malaria, procedimiento que comprende medir el nivel de células CD4 producidas en un individuo contra la vacuna candidata. Se proporciona además un procedimiento para determinar la eficacia de una vacuna candidata, en particular una vacuna candidata pre-eritrocítica, en la prevención de la malaria, procedimiento que comprende medir la concentración de anticuerpos específicos producidos en un individuo contra la vacuna candidata. En una realización más específica, esta vacuna comprende un antígeno de *Plasmodium* o un fragmento inmunogénico o derivado del mismo y un adyuvante que comprende un derivado de lípido A y una saponina en una formulación de liposoma.

Ejemplos

Ejemplo 1: Vacunación usando RTS,S y Adyuvante B y estimulación experimental con malaria.

Las Vacunas

- RTS,S: RTS es una cadena polipeptídica híbrida de 51 kDa de 424 aminoácidos (a.a.), que consta de 189 aminoácidos derivados de un antígeno superficial de esporozoíto (la repetición en tándem central de la proteína CS y las regiones carboxilo-terminales, 189 aminoácidos en total) de la cepa NF54 del parásito de la malaria *P. falciparum* (el antígeno CSP, a.a. 207 a 395), fusionada con el extremo amino terminal de la proteína S del virus de la hepatitis B. S es un polipéptido de 24 kDa (226 aminoácidos de longitud) que corresponde al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), y es el antígeno usado en la vacuna Engerix-B® de GSK Biologicals.
- Las dos proteínas se producen de forma intracelular en levaduras (*S. cerevisiae*) y se ensamblan espontáneamente en estructuras en partículas poliméricas mixtas que se estima que cada una contiene aproximadamente 100 polipéptidos.

La preparación de RTS,S se describe en el documento WO 93/10152.

- Una dosis completa de RTS,S/AS02A (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Bélgica) contiene 50 ug de antígeno RTS,S liofilizado, reconstituido en 500 ul de adyuvante AS02A - emulsión de aceite en agua que contiene los inmunoestimulantes 3D-MPL® (GlaxoSmithKline Biologicals, Montana, Estados Unidos) y QS21, 50 µg de cada uno.

- Una dosis completa de RTS,S/Adyuvante B (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Bélgica) contiene 50 ug de antígeno RTS,S liofilizado, reconstituido en 500 ul de adyuvante B que contiene los inmunoestimulantes 3D-MPL® y QS21 (50 ug de cada uno) en una formulación con liposomas que contienen colesterol. Los liposomas pueden prepararse a partir de una mezcla de fosfatidilcolina des-oleica (DOPC), colesterol y 3D-MPL en un disolvente orgánico, donde la mezcla está secada. Después, se añade una solución acuosa para suspender el lípido. La suspensión se microfluidiza hasta que el tamaño del liposoma se reduce para poder filtrarse a esterilidad a través de un filtro de 0,2 µm. De forma típica, la proporción de colesterol:fosfatidilcolina es de 1:4 (p/p), y la solución acuosa se añade para dar una concentración final de colesterol de 5 a 50 mg/ml. Se añade QS21 a los liposomas que contienen colesterol.

Metodología

- Este ensayo clínico ha evaluado la seguridad, reactogenicidad, inmunogenicidad y eficacia preliminar de una vacuna contra la malaria que contiene el antígeno RTS,S potenciado con adyuvante AS02A o adyuvante B.

Se reclutaron 103 sujetos en dos cohortes y se aleatorizaron para recibir 3 dosis de cada vacuna de acuerdo con un programa de vacunación de 0, 1, 2 meses. A causa de la gran cantidad, las cohortes se reclutaron y estimularon secuencialmente.

- Para cada cohorte, se pidió a los voluntarios que experimentaran una estimulación con malaria principal normalizada (Chulay, 1986) de dos a cuatro semanas después de la tercera dosis. La estimulación principal implicó permitir que cinco mosquitos *Anopheles stephensi* infectados con esporozoíto de *P. falciparum* se alimentaran de cada voluntario de estimulación durante un periodo de cinco minutos. Para cada cohorte, también se estimularon doce voluntarios de control no vacunados.
- Aproximadamente seis meses después de la estimulación principal, a los voluntarios que fueron protegidos en la estimulación principal se les pidió que experimentaran una estimulación repetida. No se administraron dosis adicionales de la vacuna entre las estimulaciones. La estimulación repetida se realizó según la estimulación principal. Para cada cohorte, también se estimularon seis voluntarios de control no vacunados.

- Después de cada estimulación, se siguió diariamente a los sujetos durante un periodo de al menos 30 días para evaluar si se habían infectado con malaria. El procedimiento principal para detectar infección fue una evaluación de un frotis de sangre periférica con tinción con Giesma para detectar parásitos en fase asexual por microscopía óptica. Esto indica que un sujeto ha experimentado una infección productiva, habiéndose liberado parásitos del hígado y habiendo progresado a fase eritrocítica. Por tanto, la protección estéril contra estimulación no se ha conseguido. Al primer signo

de infección los sujetos se declararon positivos para la malaria y recibieron una dosis de curación de cloroquina. La lectura de eficacia principal fue protección estéril, es decir, que el sujeto nunca desarrolló parasitemia en fase asexual. Además, se registró el tiempo entre la estimulación y la aparición de parasitemia en aquellos que no estuvieron completamente protegidos.

- 5 Además, se recogieron muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) antes de la vacunación, y 2 semanas después de la vacunación II y 14-28 días después de la vacunación III (Día de estimulación: DOC).

- Se usaron muestras de PBMC para evaluar las respuestas de células T CD4 y CD8 por citometría de flujo de citocinas. La última tecnología permite la cuantificación de células T específicas para un antígeno dado. Se contaron las células T CD4 y CD8 específicas de antígeno por citometría de flujo después de marcaje convencional por inmunofluorescencia del fenotipo celular así como la producción de citocinas intracelulares. En resumen, pueden reestimularse células T CD4 y CD8 específicas de antígeno de sangre periférica in vitro para que produzcan IL-2, CD40L, TNF-alfa o IFN-gamma cuando se incuban con su antígeno correspondiente. Se usaron combinaciones de péptido tanto HBs (antígeno de superficie de la hepatitis B) como CSP, como antígenos para reestimar las células T específicas de antígeno. Los resultados se expresaron como frecuencia de células T CD4 o CD8 que expresan al menos dos diferentes citocinas entre CD40L, IL-2, TNF-alfa, o IFN-gamma en la sub-población de células T CD4 o CD8.

Resultados

Cohorte 1:

Adyuvante	Cantidad de voluntarios vacunados	Cantidad de voluntarios estimulados (cantidad protegida)	Cantidad de voluntarios reestimulados (cantidad protegida)
Adyuvante B	26	17 (10)	5 (3)
AS02A	25	24 (9)	5 (1)
TOTAL:	51	41	10

Cohorte 2:

Adyuvante	Cantidad de voluntarios vacunados	Cantidad de voluntarios estimulados (cantidad protegida)	Cantidad de voluntarios reestimulados (cantidad protegida)
Adyuvante B	Dato no disponible	19 (8)	No realizado
AS02A	Dato no disponible	20 (5)	No realizado
TOTAL:	52	39	

Cohortes 1 y 2 combinadas para la estimulación principal:

Adyuvante	Cantidad de voluntarios vacunados y estimulados (estimulación principal)	Cantidad de voluntarios protegidos	Cantidad de voluntarios infectados	Eficacia de la vacuna
Adyuvante B	36	18	18	50 %
AS02A	44	14	30	32 %

- 25 Así, en este estudio, se encontró que el adyuvante B era más eficaz para proteger individuos sin tratamiento previo frente a infección por malaria. El 50 % de los individuos estimulados del grupo de adyuvante B estuvieron protegidos en comparación con el 32 % de los individuos estimulados del grupo AS02A. Esto representa una mejora en la protección entre los dos adyuvantes de más del 50 %.

Además, en la cohorte 1, se descubrió que el adyuvante B era significativamente más potente que AS02A para inducir respuestas de células T CD4 dirigidas contra antígenos presentes en RTS,S (Figura 1. $p=0,01663$). Los datos combinados para las cohortes 1 y 2 fueron menos significativos (Figura 2. $p=0,07$).

Antes de la vacunación, no hubo respuestas de células T CD4/CD8 detectables dirigidas contra HBs o CSP. Por el contrario, se detectaron células T CD4 específicas de HBs y CSP 2 semanas después de la vacunación II así como 2 semanas después de la vacunación III (DOC: día de estimulación) en la mayoría de los individuos vacunados con ambas formulaciones. En los mismos momentos puntuales, no se observaron respuestas de células T CD8 detectables. Estas observaciones demuestran que el ensayo usado para el control inmune de células T es específico y sensible, que es un prerrequisito para realizar una comparación formal entre grupos que están recibiendo formulaciones diferentes de vacunas.

La **Figura 1** muestra que los individuos de la cohorte 1 vacunados con RTS,S/adyuvante B tienen una frecuencia superior de células T CD4 específicas de CSP en comparación con los vacunados con RTS,S/AS02A 2 semanas después tanto de la vacunación II como de la vacunación III (DOC). Puede sacarse una conclusión similar para células T CD4 específicas de HBs que producen IFN-gamma y otra citocina entre IL-2, CD40L, TNF-alfa 2 semanas después de la vacunación II (datos no mostrados).

La **Figura 2** muestra el mismo estudio que la Figura 1, excepto que incorpora los datos de ambas cohortes.

En las Figuras 1 y 2, los resultados se expresan como una frecuencia de células T CD4 que expresan al menos dos citocinas diferentes entre CD40L, IL-2, TNF-alfa, o IFN-gamma en 10^6 células T CD4.

Se puede ver un resultado similar en términos de respuestas de anticuerpos específicos anti-CSP. A partir de la **Figura 5** se puede observar que la concentración de anticuerpos provocados en respuesta a RTS,S/adyuvante B fue significativamente mayor que la concentración provocada en respuesta a RTS,S/AS02A (véase particularmente DOC – 2 semanas después de la vacunación III ($p=0,00793$), pero un efecto es perceptible 2 semanas después de la vacunación II). Los resultados se expresan como la concentración media geométrica (CMG). Pre se refiere al punto temporal de partida, antes de que se administre cualquier dosis.

M1 se refiere al punto temporal 2 semanas después de la primera dosis.

M2 se refiere al punto temporal 2 semanas después de la segunda dosis.

DOC se refiere a la "Fecha de la estimulación", que es de 2 semanas después de la tercera dosis.

La protección contra la estimulación con la malaria está asociada con una respuesta de células T CD4 superior significativa a CSP.

La inmunogenicidad aumentada de RTS,S/adyuvante B en comparación con RTS,S/AS02A no implica necesariamente que se traduzca en un efecto biológicamente relevante. Sin embargo, los individuos vacunados con RTS,S/adyuvante B en este ensayo han mostrado un nivel aumentado de protección (18 de 36 individuos: 50 %) contra estimulación con la malaria en comparación con los vacunados con RTS,S/AS02A (14 de 44 individuos: 32 %). Por lo tanto, se ha descubierto una posible unión entre la amplitud de la respuesta de células T CD4 y la protección contra la malaria.

Si la hipótesis anterior es cierta, los individuos protegidos deben tener una respuesta de células T CD4 superior que los individuos vacunados con RTS,S/AS02A o incluso RTS,S/adyuvante B. Las **Figuras 3 y 4**, para la 1ª cohorte y las cohortes combinadas respectivamente, confirman claramente la hipótesis anterior y apoyan la idea de que las células T CD4 específicas de CSP juegan un papel significativo en la protección. Por consiguiente, el análisis estadístico hecho sobre las muestras recogidas 2 semanas después de la vacunación II así como 2 semanas después de la vacunación III demuestran que la diferencia en la frecuencia entre individuos protegidos y no protegidos es estadísticamente significativa.

En las Figuras 3 y 4 los resultados se expresan como una frecuencia de células T CD4 que expresan al menos dos citocinas diferentes entre CD40L, IL-2, TNF-alfa, o IFN-gamma en 10^6 células T CD4. Los análisis de inmunogenicidad también indican que, en contraste con células T CD4 específicas de CSP, las células T CD4 específicas de HBs no están asociadas con la protección contra la malaria 2 semanas después de la vacunación II así como 2 semanas después de la vacunación III ($p=0,14$ y $p=0,053$, respectivamente). Esto consolida adicionalmente la relevancia de los resultados anteriores y sugiere fuertemente que la protección está específicamente unida a la presencia de células T CD4 capaces de reconocer péptidos CSP pero no péptidos HBs.

Finalmente, como no hay una respuesta de células T CD8 detectable, puede también concluirse que, muy probablemente, la protección contra la fase pre-eritrocítica de la malaria otorgada por RTS,S potenciada con adyuvante B o AS02A no se debe a la inducción de células T CD8 específicas de CSP después de la vacunación.

Se observa una situación similar a partir de la supervisión de respuestas de anticuerpos específicos anti-CSP. La Figura 6 muestra concentraciones de anticuerpos en individuos protegidos y no protegidos (los resultados se relacionan con ambas cohortes con ambos grupos de adyuvantes combinados).

Está claro que aquellos individuos que están protegidos muestran concentraciones de anticuerpos mayores que aquellos que no están protegidos. ($P < 0,0001$)

Análisis final

Los resultados anteriores demuestran claramente que existe una unión directa/indirecta entre la respuesta de células T CD4 específicas de CSP y el estado protector contra la estimulación con malaria. El mecanismo por el que las células T CD4 específicas de CSP podrían ejercer un efecto antiparasitario no es conocido. Sin embargo, el análisis también identifica claramente una minoría de individuos que tiene una alta respuesta de células T CD4 que no están protegidos. Esto significa que la respuesta de células T CD4 fuerte (alta frecuencia) contra CSP completo sola no predice la protección contra estimulación con malaria.

Se han desarrollado tecnologías diferentes para controlar las respuestas de células T tales como linfoproliferación, secreción de citocinas, tinción con tetrámeros, elipsot o citometría de flujo de citocinas. La última se ha seleccionado recientemente como tecnología principal en base a los datos de repetibilidad/reproducibilidad excelentes así como una detección de marcadores determinantes (CD4, CD8, CD40L, IL-2, TNF, IFN γ). También se ha identificado una metodología analítica específica, que resuelve los grandes problemas de fondo a menudo observados con técnicas de citometría de flujo de citocinas. El presente informe demuestra la viabilidad del uso de citometría de flujo de citocinas para un control robusto de las respuestas de células T en un ensayo clínico en seres humanos. Además, también demuestra que es posible identificar un marcador sucedáneo de protección que no está directamente relacionado con la inmunidad humoral.

Aunque se ha demostrado que el adyuvante B es significativamente más potente que la formulación con AS02A para inducir células T CD4 específicas de CSP y anticuerpos, la diferencia en términos de frecuencia de células T CD4 es relativamente moderada y podría concluirse que puede no ser biológicamente relevante. Los datos obtenidos en este ensayo clínico permiten una evaluación formal de la relevancia biológica de dichas diferencias usando datos de protección contra la malaria como marcador biológicamente relevante. El análisis indica claramente que diferencias moderadas pero significativas entre adyuvantes en términos de frecuencias de células T se traducen en un grado significativamente superior de protección contra estimulación con malaria.

Referencias

- 25 • Alonso P y col. (2004) Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* Oct; 364: 1411-1420.
- Alonso y col. (2005) Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet*. Dec 10; 366 (9502): 2012-8.
- 30 • Ballou WR, Arevalo-Herrera M, Carucci D, Richie TL, Corradin G, Diggs C, y col. (2004) Update on the clinical development of candidate malaria vaccines. *Am J Trop Med Hyg*; 71 (supl 2): 239-247.
- Bojang KA, Milligan PJM, Pinder M, Vigneron L, Allouche A, Kester KE, y col. (2001) Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial. *The Lancet*; 358 (9297): 1927-1934.
- 35 • Bojang KA, Oludude F, Pinder M, Ofori-Anyinam O, Vigneron L, Fitzpatrick S, Njie F, Kassanga A, Leach A, Milman J, Rabinovich R, McAdam KPWJ, Kester KE, Heppner DG, Cohen JD, Tornieporth N, and Milligan PJM. (2005) Safety and immunogenicity of RTS,S/AS02A candidate malaria vaccine in Gambian children. *Vaccine* 23 (32): 4148-57.
- Breman JG, Alilio MS, Mills A. (2004) The intolerable burden of malaria: what's new, what's needed. *Am J Trop Med Hyg*; 71(supl. 2): 0-i-.
- 40 • Caspers y col. (1989) The circumsporozoite protein gene from NF54, a *Plasmodium falciparum* isolate used in malaria vaccine trials. *Mol. Biochem. Parasitol* 35, 185-190.
- Chulay y col. (1986) Malaria transmitted to humans by mosquitoes infected from cultured *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*. Jan; 35 (1): 66-8.
- 45 • Doherty J, Pinder M, Tornieporth N, Carton C, Vigneron L, Milligan P, y col. (1999) A phase I safety and immunogenicity trial with the candidate malaria vaccine RTS,S/SBAS2 in semi-immune adults in The Gambia. *Am J Trop Med Hyg*; 61 (6): 865-868.
- Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW. (2004) The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *The Lancet Infectious Diseases*; 4 (6): 327-336.
- 50 • Hilgers y col. (1986). Synergistic effects of synthetic adjuvants on the humoral immune response. *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 79 (4): 392-6.

- Hilgers y col. (1987). Synthetic sulpholipopolysaccharides: novel adjuvants for humoral immune responses. *Immunology*, 60 (1): 141-6.
- Hoffman SL (1996) "Malaria Vaccine Development: a multi-immune response approach" Am Soc Microbiol Press Ed Hoffman SL, capítulo 3 "Attacking the infected hepatocyte"
- 5 • Kensil CR, Patel U, Lennick M, Marciani D. (1991) Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *J. Immunology* vol 146, 431-437.
- Kensil, C. R. (1996) Saponins as vaccine adjuvants. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 12 (1-2):1-55.
- Kester KE, McKinney DA, Tornieporth N, y col. (2001) Efficacy of recombinant circumsporozoite protein vaccine regimens against experimental *Plasmodium falciparum* malaria. *J.Infect.Dis.*; 183 (4): 640-7.
- 10 • Lacaille-Dubois, M and Wagner H.,(1996) A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* vol 2 págs. 363-386.
- Lalvani A, Moris P, Voss G, y col. (1999) Potent induction of focused Th1-type cellular and humoral immune responses by RTS,S/SBAS2, a recombinant *Plasmodium falciparum* malaria vaccine. *J. Infect. Dis.*; 180 (5): 1656-64.
- 15 • Macete E, Aponte JJ, Guinovart C, Sacarlal J, Mandomando I, Espasa M, y col. Safety, reactogenicity and immunogenicity of the RTS,S/AS02A candidate malaria vaccine in children aged 1 to 4 years in Mozambique. Vaccine submitted.
- Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*, 7, pág. 145-173.
- 20 • Musti A.M. y col., (1983) Transcriptional mapping of two yeast genes coding for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isolated by sequence homology with the chicken gene. *Gene* 1983, 25 133-143.
- Powell and Newman (Editors) (1995) Vaccine Design - the subunit and adjuvant approach. *Pharmaceutical Biotechnology*, Vol. 61, Plenum Press New York.
- 25 • Ribi y col. (1986) Modulation of humoral and cell-mediated immune responses by a structurally established nontoxic lipid A. *Immunobiology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins*. Plenum Publ. Corp., NY, págs. 407-420.
- Stoute J, Slaoui M, Heppner D, Momin P, Kester K, Desmons P, y col. (1997) A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. *N Engl J Med*; 336 (2): 86-91.
- 30 • Stoute, JA, Kester KE, Krzych U, Welde BT, Hall T, White K, Glenn G, Ockenhouse CF, Garçon N, Schwenk R, Lanar DE, Momin P, Golenda C, Slaoui M, Wortmann G, Cohen J, Ballou WR. (1998) Long Term Efficacy and Immune Responses Following Immunization with the RTS,S Malaria Vaccine. *J Infect Dis* 178: 1139-44.
- Sun P, Schwenk R, White K, Stoute JA, Cohen J, Ballou WR, Voss G, Kester KE, Heppner DG, Krzych U. (2003) Protective immunity induced with malaria vaccine, RTS,S, is linked to *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-specific CD4(+) and CD8(+) T cells producing IFN-gamma. *J Immunol*. Dec 15; 171 (12): 6961-7.
- 35 • Valenzuela P, Gray P, Quiroga M, Zaldivar J, Goodman H, Rutter W. (1979) Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B virus surface antigen. *Nature* 280, 815 - 819.
- Voller y col. (Editor) (1978) *New Trends and Developments in Vaccines*. University Park Press, Baltimore, Maryland, Estados Unidos.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 <110> GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. Cohen, Joseph
- <120> VACUNAS
- <130> VB61495/PCT
- <150> GB 0513421.8
- <151> 30-06-2005
- 45 <160> 3

<170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 4
 <212> PRT
 5 <213> plasmodium falciparum
 <400> 1
 Asn Ala Asn Pro
 1
 <210> 2
 10 <211> 4
 <212> PRT
 <213> plasmodium falciparum
 <400> 2
 Asn Val Asp Pro
 15 1
 <210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> virus de la hepatitis B
 20 <400> 3
 Pro Val Thr Asn
 1

REIVINDICACIONES

1. El uso de un antígeno de *Plasmodium* o un fragmento inmunogénico o fragmentos inmunogénicos del mismo y un adyuvante que comprende 3D-MPL y QS21 en una formulación de liposoma, en la fabricación de un medicamento para inmunizar viajeros a regiones endémicas contra infección productiva por malaria, en el que el antígeno de *Plasmodium* es la proteína circunsporozoíto (CS) o un fragmento inmunogénico o fragmentos inmunogénicos de la misma capaces de provocar una respuesta inmunitaria contra *Plasmodium* y en el que la proteína CS o un fragmento de la misma está fusionada con el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg).
2. El uso según la reivindicación 1, en el que la proteína CS o fragmento o fragmentos de la misma está en forma de una proteína híbrida que comprende toda la porción C-terminal de la proteína CS de *Plasmodium*, cuatro o más repeticiones en tándem de la región inmunodominante de la proteína CS, y el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg).
3. El uso según la reivindicación 1 o 2, en el que la proteína híbrida comprende una secuencia de la proteína CS de *P. falciparum* que corresponde a los aminoácidos 207-395 de la proteína CS del clon 3D7 de la cepa NF54 de *P. falciparum* fusionada en trama mediante un engarce lineal al extremo N-terminal de HBsAg.
4. El uso según la reivindicación 3, en el que la proteína híbrida es RTS.
5. El uso según la reivindicación 4, en el que la RTS está en forma de partículas RTS,S mixtas.
6. El uso según la reivindicación 5, en el que la cantidad de RTS,S es 25 o 50 µg por dosis.
7. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el QS21 está inactivado en liposomas que contienen colesterol.
8. El uso según la reivindicación 7, junto con un polinucleótido que codifica el antígeno de *Plasmodium* o un fragmento inmunogénico o fragmentos inmunogénicos del mismo, en el que la mezcla antígeno/adyuvante y el polinucleótido son para su uso secuencial en cualquier orden.
9. El uso según la reivindicación 8, en el que el polinucleótido es usado primero.
10. Una formulación que comprende un antígeno de *Plasmodium* o un fragmento inmunogénico o fragmentos inmunogénicos del mismo y un adyuvante, que comprende 3D-MPL y QS21 en una formulación de liposoma, para su uso en la inmunización de viajeros a regiones endémicas contra infección productiva por malaria, en la que el antígeno de *Plasmodium* es la proteína circunsporozoíto (CS) o un fragmento inmunogénico o fragmentos inmunogénicos de la misma capaces de provocar una respuesta inmunitaria contra *Plasmodium* y en la que la proteína CS o un fragmento de la misma está fusionada con el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg).
11. La formulación para su uso según la reivindicación 10, en la que la proteína CS o fragmento o fragmentos de la misma está en forma de una proteína híbrida que comprende toda la porción C-terminal de la proteína CS de *Plasmodium*, cuatro o más repeticiones en tándem de la región inmunodominante de la proteína CS, y el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg).
12. La formulación para su uso según la reivindicación 10 u 11, en la que la proteína híbrida comprende una secuencia de la proteína CS de *P. falciparum* que corresponde a los aminoácidos 207-395 de la proteína CS del clon 3D7 de la cepa NF54 de *P. falciparum* fusionada en trama mediante un engarce lineal al extremo N-terminal de HBsAg.
13. La formulación para su uso según la reivindicación 12, en la que la proteína híbrida es RTS.
14. La formulación para su uso según la reivindicación 13, en la que la RTS está en forma de partículas RTS,S mixtas.
15. La formulación para su uso según la reivindicación 14, en la que la cantidad de RTS,S es 25 o 50 µg por dosis.
16. La formulación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en la que el QS21 está inactivado en liposomas que contienen colesterol.
17. La formulación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, para su uso como parte de un régimen de sensibilización/refuerzo, en la que una parte adicional comprende un polinucleótido que codifica el antígeno de *Plasmodium* o un fragmento inmunogénico o fragmentos inmunogénicos del mismo, en la que la mezcla antígeno/adyuvante y el polinucleótido son para su uso secuencial en cualquier orden.
18. La formulación para su uso según la reivindicación 17, en la que el polinucleótido es usada primero.
19. El uso de un antígeno de *Plasmodium* o un fragmento inmunogénico o fragmentos inmunogénicos del mismo y un adyuvante que comprende 3D-MPL y QS21 en una formulación de liposoma, en la fabricación de un kit para inmunizar viajeros a regiones endémicas contra infección por malaria, en el que el antígeno es proporcionada en forma liofilizada y el antígeno y el adyuvante son mezclados antes de la administración, en el que el antígeno de *Plasmodium* es la

proteína circumsporozoíto (CS) o un fragmento inmunogénico o fragmentos inmunogénicos de la misma capaces de provocar una respuesta inmunitaria contra *Plasmodium* y en la que la proteína CS o un fragmento de la misma está fusionada con el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg).

Figura 1 - Respuesta de células T CD4 contra CSP (Primera cohorte)

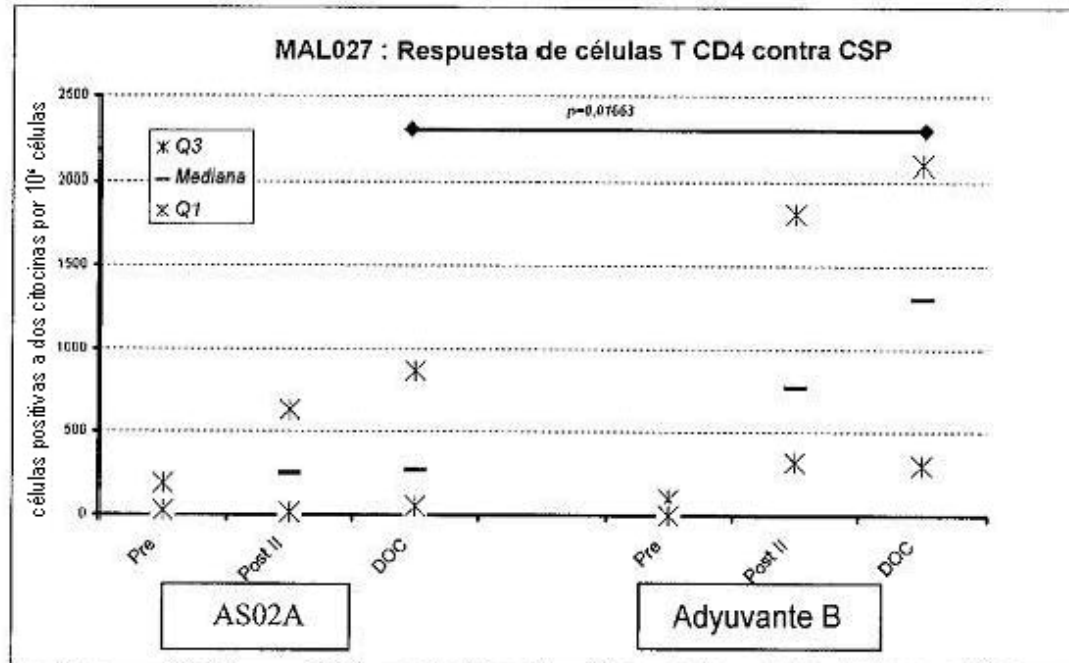


Figura 2 - Respuesta de células T CD4 contra CSP (Ambas cohortes)

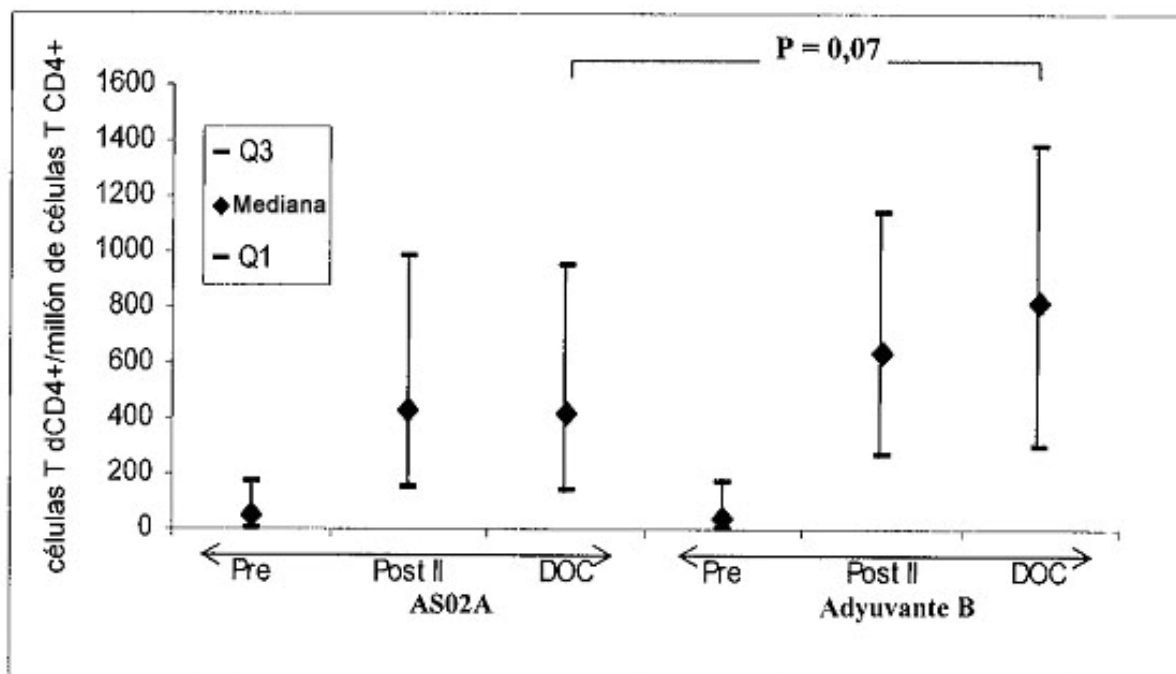


Figura 3 - Respuesta de células T CD4 contra CSP (Primera cohorte)

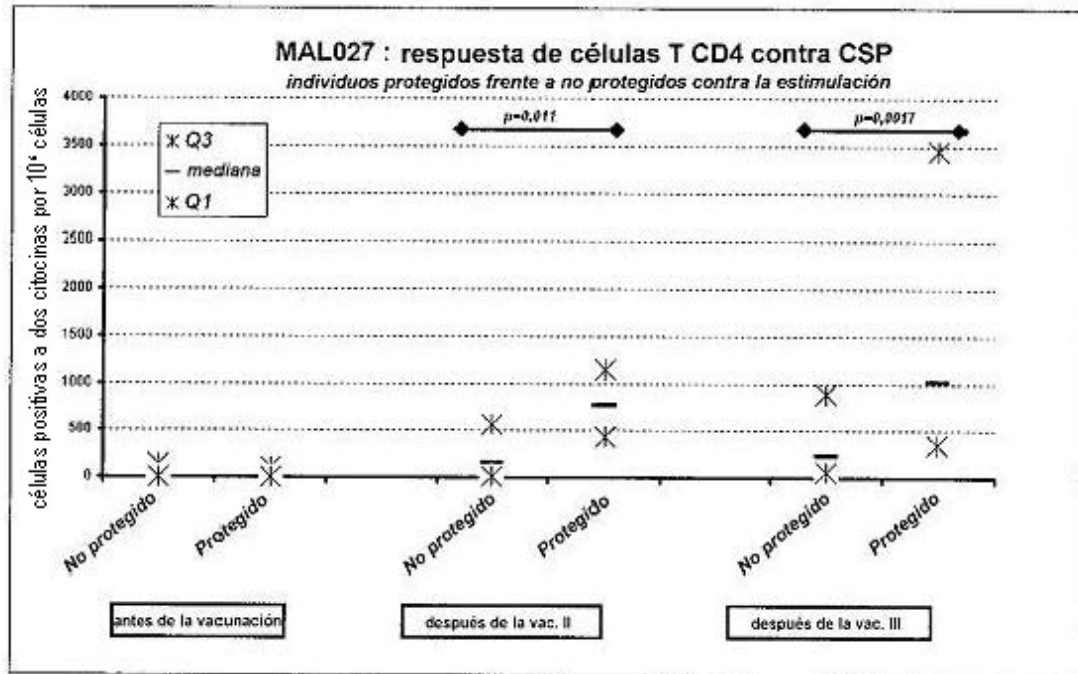


Figura 4 - Respuesta de células T CD4 contra CSP (Ambas cohortes)

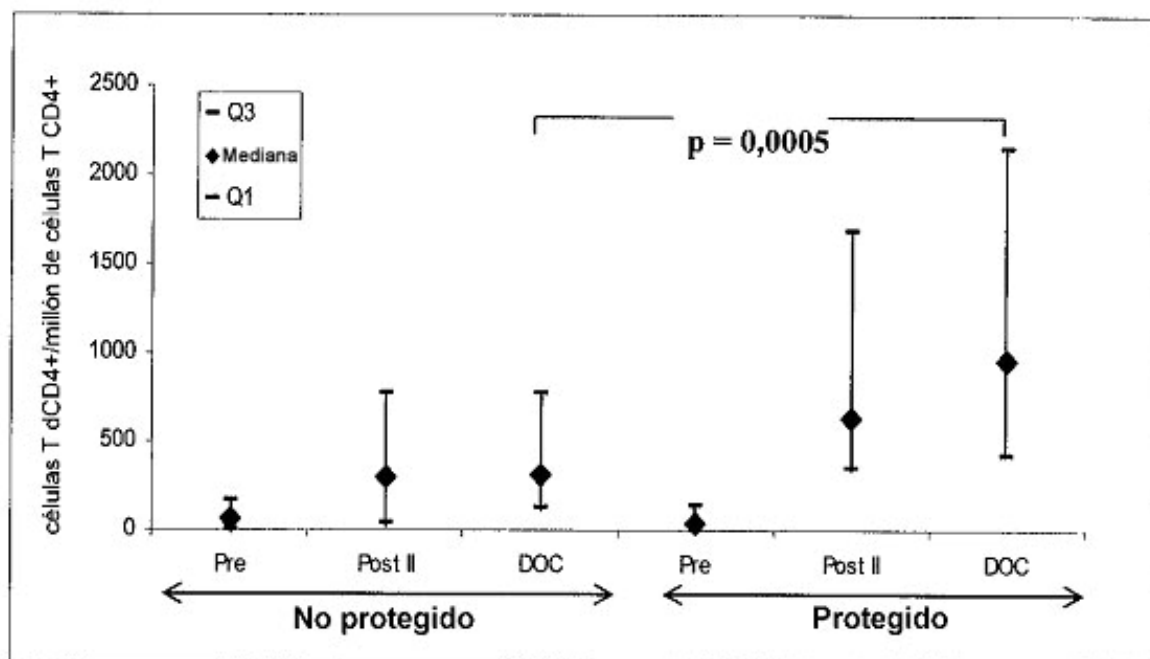


Figura 5 - Respuesta de anticuerpos anti-CSP (Ambas cohortes)

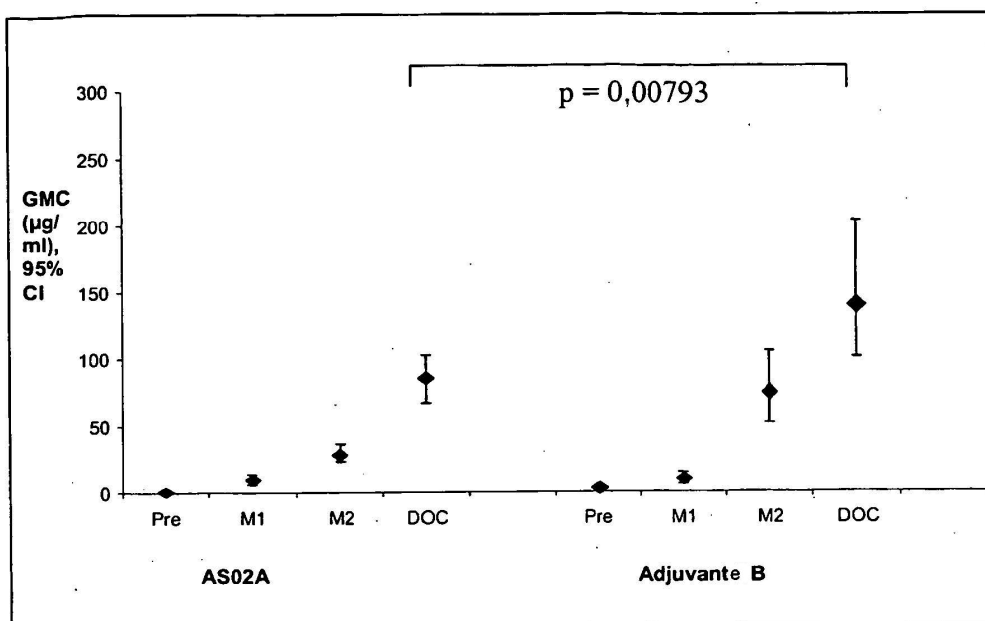


Figura 6 - Respuesta de anticuerpos anti-CSP (Ambas cohortes)

