

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 347**

51 Int. Cl.:

| | |
|--------------------|-----------|
| A61K 39/00 | (2006.01) |
| A61K 39/08 | (2006.01) |
| A61K 39/02 | (2006.01) |
| A61K 39/05 | (2006.01) |
| A61K 39/12 | (2006.01) |
| A61K 39/102 | (2006.01) |
| A61K 39/015 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.08.2008 PCT/EP2008/060505**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.02.2009 WO09021931**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2008 E 08787080 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2190470**

54 Título: **Vacunas**

30 Prioridad:

13.08.2007 US 955445 P
22.08.2007 US 957338 P
26.10.2007 US 982801 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.03.2018

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
RUE DE L'INSTITUT 89
1330 RIXENSART, BE

72 Inventor/es:

BALLOU, WILLIAM, RIPLEY y
COHEN, JOSEPH, D

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 658 347 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

5 La presente invención se refiere a un uso novedoso de un antígeno de malaria para inmunizar contra la enfermedad de la malaria. La invención se refiere en particular al uso de la proteína circumesporozoíto (CS) de *P. falciparum* o fragmentos de la misma, para inmunizar bebés contra la enfermedad de la malaria.

10 La malaria es uno de los mayores problemas sanitarios del mundo. Durante el siglo 20, el desarrollo económico y social, junto con las campañas contra la malaria, han conseguido la erradicación de la malaria de grandes áreas del mundo, reduciendo el área afectada de la superficie mundial del 50% al 27%. Sin embargo, dado el crecimiento de la población esperada, se prevé que para 2010 la mitad de la población mundial, casi 3,5 miles de millones de personas, vivirán en áreas en las que se transmite la malaria ¹. Las estimaciones actuales sugieren que se producen bastante más de 1 millón de muertes debidas a la malaria al año, y se cree que los costes económicos sólo para África son asombrosos y en el entorno de al menos varios miles de millones de dólares americanos al año².

15 Estas cifras remarcen la crisis global de la malaria y los retos que plantea a la comunidad internacional. Las razones de esta crisis son múltiples y van desde la emergencia de una resistencia muy extendida a los fármacos disponibles, de precio razonable y anteriormente muy eficaces, al desmoronamiento y falta de adecuación de los sistemas sanitarios a la falta de recursos. A no ser que se encuentren formas de controlar esta enfermedad, fracasarán los esfuerzos globales de mejorar la salud y la supervivencia infantiles, de reducir la pobreza, aumentar la seguridad y fortalecer las sociedades más vulnerables.

20 Una de las formas más agudas de la enfermedad la provoca el parásito *Plasmodium falciparum* que es responsable de la mayoría de la mortandad atribuible a la malaria.

25 El ciclo vital de *Plasmodium* es complejo siendo necesarios dos huéspedes, el hombre y el mosquito, para completarse. La infección en el hombre se inicia mediante la introducción de esporozoítos de la saliva de un mosquito infectado que pica. Los esporozoítos migran al hígado y allí infectan a los hepatocitos en los que se diferencian y multiplican, mediante la etapa intracelular exoeritrocítica, hasta la etapa de merozoíto que infecta los glóbulos rojos (RBC) iniciando una replicación cíclica en la etapa asexual en sangre. El ciclo se completa mediante la diferenciación de un número de merozoítos de los glóbulos rojos en gametocitos en etapa sexual, que son ingeridos por el mosquito, en el que se desarrolla a través de una serie de etapas en el intestino medio produciendo esporozoítos que migran a la glándula salivar.

30 La etapa de esporozoíto del *Plasmodium* se ha identificado como diana potencial de la vacuna contra la malaria. Se ha demostrado que la vacunación con esporozoíto inactivado (irradiado) inducía protección contra la malaria humana de forma experimental (Am. J. Trop. Med. Hyg 24: 297-402, 1975). Sin embargo, no ha sido posible ni práctica ni logísticamente fabricar una vacuna contra la malaria para la población general basándose en esta metodología, empleando esporozoítos irradiados.

35 La proteína superficial principal del esporozoíto se denomina proteína circumesporozoíto (proteína CS). Se cree que está implicada en la motilidad e invasión del esporozoíto durante su paso desde el sitio inicial de la inoculación por el mosquito a la circulación, donde migra al hígado.

La proteína CS de la especie *Plasmodia* se caracteriza por un dominio repetitivo central (región de repetición) flanqueado por fragmentos amino no repetitivos (extremo N) y carboxi (extremo C). La proteína CS de *P. falciparum* tiene una región de repetición central que está muy conservada.

40 Diversos grupos han propuesto vacunas con subunidades basadas en diversas formas o partes de la proteína circumesporozoíto. Dos de estas vacunas que se basan exclusivamente en la secuencia de repetición central se han sometido a ensayos clínicos al principio de los años 80 del siglo XX; uno es un péptido sintético, el otro es una proteína recombinante (Ballou y cols Lancet: 6 de junio (1987) página 1277 y siguientes, y Herrington y cols Nature 328:257 (1987)). Estas vacunas tuvieron éxito para estimular una respuesta contra el esporozoíto. Sin embargo, la magnitud de la respuesta fue decepcionante, y algunas vacunas no produjeron ninguna respuesta. Además, la ausencia de "refuerzo" de los niveles de anticuerpos tras inyecciones subsiguientes y los resultados de los ensayos de proliferación de linfocitos *in vitro* sugirieron que los linfocitos T de la mayoría de estos voluntarios no reconocían la repetición inmunodominante. Además, la eficacia de estas dos vacunas era insignificante y sólo un voluntario vacunado no desarrolló parasitemia. Estas vacunas por lo tanto no se desarrollaron más.

50 Los documentos WO 93/10152 y WO 98/05355 describen una vacuna derivada de la proteína CS de *P. falciparum* y queda claro que se ha habido algún progreso en la vacunación contra *P. falciparum* usando la estrategia que se describe en esos documentos, véase también Heppner y cols. 2005, Vaccine 23, 2243-50.

55 La proteína CS de *P. falciparum* ha sido clonada, expresada y secuenciada en una variedad de cepas, por ejemplo en la cepa NF54, clon 3D7 (Caspers y cols., Mol. Biochem. Parasitol. 35, 185-190, 1989). La proteína de la cepa 3D7 se caracteriza por tener una región de repetición inmunodominante central que comprende un tetrapéptido Asn-Ala-Asn-Pro repetido 40 veces pero intercalado por cuatro repeticiones menores Asn-Val-Asp-Pro. En otras

cepas, varía el número de repeticiones mayores y menores así como su posición relativa. Esta porción central está flanqueada por una porción en los extremos N y C compuesta por secuencias de aminoácidos no repetitivas que se denominan porción sin repeticiones de la proteína CS.

5 La vacuna contra la malaria RTS,S de GlaxoSmithKline Biologicals basada en la proteína CS se ha estado desarrollando desde 1987 y actualmente es el candidato a vacuna contra la malaria más avanzada que se está estudiando⁴. Esta vacuna está dirigida específicamente contra la etapa pre-eritrocítica de *P. falciparum*, y confiere protección contra la infección por los esporozoítos de *P. falciparum* inoculados por mosquitos infectados criados en laboratorio en voluntarios adultos no expuestos a la malaria, y contra la exposición natural en adultos seminmunizados^{5,6}.

10 Se usó RTS,S/AS02A (RTS,S más un sistema adyuvante) en estudios consecutivos de fase I realizados en Gambia en niños con edades comprendidas entre 6-11 y 1-5 años, que confirmaron que la vacuna era segura, se toleraba bien y era inmunógena⁷. Posteriormente, se seleccionó una dosis de vacuna pediátrica y se estudió en un estudio de fase I en niños mozambiqueños con edades comprendidas entre 1-4 años, en el que se encontró que era segura, se toleraba bien y era inmunógena⁸.

15 El documento WO 2006/029887 describe el uso de RTS,S para tratar malaria grave en niños de 1 a 4 años de edad.

20 La enfermedad de la malaria grave se describe en la guía de la OMS de práctica clínica (Página 4: World Health Organization. Management of severe malaria, a practical handbook. Segunda edición, 2000. <http://mosquito.who.int/docs/hbsm.pdf>). La clasificación de los niños de acuerdo con la definición de la OMS de malaria grave identifica a niños que están muy enfermos y que presentan un alto riesgo de morir. Alto riesgo puede considerarse que significa un riesgo de morir de aproximadamente 30% o más.

25 En el estudio clínico 026 los niños con edades comprendidas entre 1-4 en Mozambique, se calculó que la eficacia global de la vacuna contra la infección estaba en el entorno del 45% medida en términos de un retraso en el tiempo hasta el inicio de la detección de parásitos en la sangre de un niño relevante. El porcentaje de protección contra la enfermedad clínica estaba en el entorno del 35% y la protección porcentual contra la enfermedad de la malaria grave estaba en el entorno del 50%. Se encontró que este nivel de eficacia persistía durante un periodo de aproximadamente 18 meses. (Alonso y cols 2004 Lancet: 364, página 1411-1420 y Alonso y col 2005, Lancet 366 páginas 2012-2018.)

30 En el ensayo 026 no se encontraron indicios de interacción entre la edad y la eficacia general de la vacuna contra la enfermedad de la malaria clínica no grave, lo que sugiere que la eficacia no cambiaba significativamente al aumentar la edad. Sin embargo, se realizó un análisis exploratorio ulterior de un subgrupo para estimar la eficacia de la vacuna en los grupos de menor edad que se llevan la peor parte de la enfermedad de la malaria.

35 De forma interesante, este subanálisis parecía sugerir que la eficacia contra la malaria grave puede haber sido más elevada en los niños más pequeños de ese ensayo. Por este análisis no se sugería que la protección contra la infección o la eficacia general es decir el retraso en el desarrollo de los síntomas de la malaria crónica fuera generalmente mejor en el grupo de menor edad.

40 Por lo que conocen los inventores, sólo se ha administrado una vacuna contra la malaria a bebés menores de 1 año debido a varias razones, que incluyen la preocupación por la potencial toxicidad de las formulaciones experimentales que contienen adyuvantes novedosos y/o teorías de que el sistema inmunitario de los bebés es inmaduro y por lo tanto no puede provocarse una protección eficaz contra infección por la malaria mediante dicha vacunación. Los potentes adyuvantes que se emplean en las formulaciones contra la malaria, que comprende por ejemplo QS21 y/o MPL no se usan generalmente en las vacunas pediátricas. En lugar de eso, las vacunas para bebés generalmente emplean los adyuvantes de sales de aluminio más antiguos.

45 Sin embargo, se realizó un ensayo en Gambia que empleaba la vacuna contra la malaria SPf66 en bebés con edades comprendidas entre 6 y 11 meses (Alonso y cols Parasite Immunology, 1997: 19: 579-581). En áreas de intensa transmisión en Tanzania, la SPf66 demostró una protección del 31% contra el primer ataque de malaria en niños con edades comprendidas entre 1 y 4 años. Sin embargo, cuando se probó en bebés con edades comprendidas entre 6 y 11 meses, los resultados parecían indicar que la incidencia de la malaria clínica en los niños que habían recibido la vacuna SPf66 era superior que la de los bebés que recibieron la formulación de control, que era una vacuna contra la polio inactivada. El efecto era más marcado entre los bebés que habían recibido una dosis alta de SPf66.

50 Se realizó un ensayo clínico reciente (denominado en el presente documento estudio 038) en bebés, algunos de tan solo 10 semanas de edad en la primera administración de la vacuna, con algunos resultados sorprendentes (véase la descripción más adelante).

55 La presente invención proporciona el uso de un antígeno derivado de la proteína CS de *Plasmodium falciparum* que se expresa en la etapa pre-eritrocítica de la infección de la malaria combinado con un adyuvante farmacéuticamente aceptable que comprende una combinación de 3D-MPL y QS21, en la fabricación de un medicamento para vacunar

bebés contra la malaria, en el que la población diana son bebés de menos de 1 año de edad y el antígeno CS está en forma de una proteína híbrida que comprende una secuencia que contiene al menos 160 aminoácidos de la porción C-terminal de la proteína CS y cuatro o más repeticiones en tándem de la región inmunodominante de la proteína CS, condensado al antígeno superficial de la hepatitis B (HBsAg).

5 **Breve descripción de los dibujos**

- La Figura 1 muestra un resumen del diseño del estudio para el ensayo 038
- La Figura 1a muestra un resumen del diseño del ensayo
- La Figura 2a muestra la incidencia de la capacidad reactógena general
- La Figura 2b muestra la incidencia de la capacidad reactógena local
- 10 La Figura 2c muestra la proporción de dosis con síntomas generales solicitados reseñados durante los 7 días posteriores a la vacunación
- La Figura 3 muestra los datos de eficacia de la vacuna.
- La Figura 4 muestra una curva de Kaplan-Meier para el ensayo 038
- La Figura 5a muestra una curva de Kaplan-Meier para el ensayo 026 (datos comparativos)
- 15 La Figura 5b muestra una curva de Kaplan-Meier para el ensayo 026 (datos comparativos)

En la Figura 3 la tabla presenta las estimaciones de VE durante un seguimiento de 14 días posteriores a la dosis 3 de RTSS o Engerix hasta el mes 6 (visita aleatoria y representativa de una población) para la cohorte de ATP. Este incluye a sujetos que recibieron al menos 3 dosis de RTS,S o Engerix-B, fármaco de aclaramiento y que tienen un tiempo de seguimiento en ADI (detección activa de la infección).. Se presentan tanto estimaciones de la VE contra la infección como contra la enfermedad. El criterio de valoración exploratorio que evaluaba la enfermedad durante un intervalo de tiempo desde el mes 0 (día de la primera vacunación) hasta el mes 6 para la cohorte de ITT se presenta en la Enfermedad 3.

En la Figura 3:

- 25 PYAR: Episodios/Años persona con riesgo;
- VE: Eficacia de la vacuna;
- CI: Intervalo de confianza
- ^a tiempo hasta el primer episodio; presencia de parasitemia asexual por *P. falciparum* > 0 por μ l
- ^b tiempo hasta el primer episodio; presencia de parasitemia asexual por *P. falciparum* > 500 por μ l y presencia de fiebre $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ en un niño que no se encuentra bien y que se le trae para ser tratado
- 30 ^c tiempo hasta el primer episodio; cualquier nivel de parasitemia asexual por *P. falciparum* y presencia de fiebre $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ o historia de fiebre en 24 horas en un niño que no se encuentra bien y que se le trae para ser tratado
- ^d tiempo hasta el primer episodio; presencia de parasitemia asexual por *P. falciparum* > 500 por μ l y presencia de fiebre $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ en un niño que no se encuentra bien y que se le trae para ser tratado (ITT 0-6)
- Estimaciones ajustadas para el área y distancia del centro de salud

35 En el contexto de esta memoria descriptiva, se pretende que malaria se refiera a la infección por malaria (se define más adelante) y/o enfermedad clínica de la malaria (también se define más adelante).

En una realización la vacunación de acuerdo con la invención proporciona un riesgo reducido de infección por malaria. En un aspecto la reducción calculada del riesgo de infección después de la vacunación es de al menos aproximadamente 30, 40, 50%, por ejemplo 60 tal como 65%.

40 En una realización la vacunación de acuerdo con la invención proporciona un riesgo reducido de desarrollar síntomas clínicos de malaria. En un aspecto el riesgo de enfermedad clínica después de recibir, por ejemplo tres dosis en un intervalo de estudio de 3 meses puede reducirse en al menos aproximadamente 30, 40, 50%, por ejemplo 60 tal como aproximadamente 65% tras la tercera dosis.

En una realización la malaria es malaria no grave.

45 En una realización la vacunación proporciona un riesgo reducido de desarrollar los siguientes síntomas de la enfermedad clínica: cualquier nivel de parasitemia asexual de *P. falciparum* y presencia de fiebre $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ o historia de fiebre en 24 horas.

En un aspecto el menor riesgo de infección por malaria y/o menor riesgo de desarrollar síntomas clínicos de malaria se evalúa en los 3 meses posteriores a la vacunación final.

50 En el estudio 038, se administraron 3 dosis de RTS,S con adyuvante en una formulación pediátrica a bebés en tres tiempos con intervalos de aproximadamente un mes (o intervalos de 4 semanas) nominalmente tiempos de 0, 1 mes y después 2 meses. Esta posología conforma un aspecto de la invención.

La vacuna puede administrarse con intervalos apropiados, por ejemplo intervalos de 2, 3, 4 ó 5 semanas tal como intervalos de 4 semanas en una dos o tres dosis.

Muchos de estos bebés muy probablemente nunca habían sido expuestos a la infección por la malaria debido a la virtualmente no hubo exposición a mosquitos infectados.

5 No se suscitaron problemas de seguridad ni de toxicidad y de hecho las vacunas contra la malaria del estudio mostraron unos perfiles de capacidad reactógena similares a una vacuna que se usa habitualmente en bebés TETRAActHib™ de Aventis Pasteur, que contiene antígenos al menos de difteria, tétanos, tos ferina y también una capacidad reactógena similar a la vacuna contra la hepatitis B Engerix-B™.

10 Además y sorprendentemente la eficacia calculada de la vacuna contra la malaria empleada en el estudio 038 fue de aproximadamente el 65% (eficacia de la vacuna ajustada) contra la malaria clínica (que en general no es grave) comparada con el grupo de control (datos de la Tabla 3). Esta eficacia es aproximadamente 30% superior a la eficacia, observada en niños más mayores, de los resultados del ensayo 026 de enfermedad clínica no grave, en el que la eficacia contra la malaria no grave estuvo entre el 30 y el 35%. Estas cifras reflejan la eficacia contra los síntomas de la malaria clínica no grave y no la eficacia contra la malaria grave, que se realizó como sub-análisis del ensayo 026. Así, la vacunación de la presente invención parece traducirse en una reducción del riesgo de adquirir la forma clínica no grave de malaria comparada con el grupo de control de este estudio y además comparada con 15 niños mayores vacunados del ensayo 026.

La malaria clínica se define en el presente documento como fiebre superior o igual a 37,5°C con una parasitemia asexual de *P. falciparum* de 500 presente por µl de sangre o más (por ejemplo con una sensibilidad y especificidad superior al 90%).

20 También fue sorprendente el hecho de que la protección porcentual contra la infección que se observó en el ensayo 038 fue de aproximadamente el 65% (Tabla 3), que los inventores creen que no tiene precedentes y es inesperada ya que el resultado comparable del ensayo 026 fue de aproximadamente 45%.

Los datos sobre la eficacia de los dos ensayos (038, véase la Tabla 3, y 026) se derivaron de periodos de observación de distinta duración.

25 La infección por malaria en este contexto se pretende que se refiera a cualquier parasitemia asexual de *Plasmodium falciparum* detectada mediante la detección activa de la infección (ADI) o detección pasiva de casos (PCD).

En el tiempo de control de tres meses (es decir 3 meses después de la última vacunación), menos del 20%, aproximadamente el 17% de los bebés vacunados con la vacuna contra la malaria del ensayo 038 mostraban signos de infección comparados con más del 40% del grupo que recibió la vacunación de comparación/control.

30 Estas observaciones llevaron a los inventores a la conclusión de que de hecho el grupo de edad óptimo para que la vacunación proporcione protección contra la infección con parásitos de la malaria y la malaria clínica es los bebés.

Un bebé en el contexto de esta memoria descriptiva tiene menos de 1 año tal como aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 semanas de edad. Más específicamente, de aproximadamente 10, aproximadamente 14 y/o aproximadamente 18 semanas se edad.

35 En una realización se administra una primera vacunación a un bebé aproximadamente de 6 a 10 semanas después del nacimiento, tal como 10 semanas.

En una realización se administra una segunda vacunación a un bebé aproximadamente de 10 a 14 semanas después del nacimiento, tal como 14 semanas.

En una realización se administra una tercera vacunación a un bebé aproximadamente de 14 a 18 semanas después del nacimiento, tal como 16-18 semanas.

40 Después de administrar la primera tanda de vacunación puede administrarse una vacunación de refuerzo. Este refuerzo puede administrarse de 6 a 24 meses después de completar dicha primera tanda.

Aunque no se desea quedar obligado por la teoría, los indicios disponibles en este ensayo 038 no sugiere que las valoraciones contra CS fueran significativamente diferentes de las observadas en el ensayo 026, aunque se observa una tendencia a una mayor GMT en 038 para los datos de hasta 3 meses posteriores a la dosis 3.

45 Así, puede ser ventajoso proporcionar la vacuna contra la malaria a bebés no expuestos antes de una exposición natural significativa a la infección por la malaria.

50 No expuestos, en el contexto de esta memoria descriptiva, se pretende que signifique que el bebé no tiene anticuerpos detectables o los tiene muy bajos contra la proteína CS, determinado por ejemplo mediante ELISA o que el bebé es tan joven que es razonable creer que no ha sufrido infección por parásitos *P. falciparum* después del nacimiento.

Un nivel bajo está bajo el nivel de corte definido para un ELISA contra CS relevante. Véase por ejemplo Gordon y cols J. Infectious Disease 1995; 171:1576-1585 o Stout y cols J. Infectious Diseases 1998; 178: 1139-1144 para

mayor información sobre ensayos adecuados.

En un aspecto de la invención al menos el 65% de los bebés tratados con la vacuna no han estado expuestos, tal como 75, 85, 90, 95 o 99%.

5 Después del nacimiento puede ser ventajoso proteger a un bebé de la exposición a la infección por la malaria pulverizando las casas y las zonas habitables/habitaciones y similares con insecticida tal como DDT. También pueden proporcionarse una protección alternativa o adicional mediante mosquiteras en las camas, que también pueden tratarse con un insecticida adecuado. Estos pasos pueden ayudar a mantener el bebé no expuesto hasta que pueda administrarse la vacuna contra la malaria.

10 De forma interesante, el ensayo 038 parece sugerir que había una correlación entre el nivel de anticuerpos generados y la protección que proporciona dicha vacunación. Los bebés con niveles de anticuerpos contra CS en el tercil superior presentaban un riesgo 71% menor de infección que los del tercil inferior.

15 En un aspecto, la invención proporciona un uso de la vacunación para generar una respuesta de anticuerpos apropiada contra una proteína CS, por ejemplo en el que el 80, 85, 90, 95, 96, 97 o 98% de los bebés vacunados de acuerdo con la invención tienen anticuerpos contra CS superiores al límite de corte para un ELISA relevante (tal como el que usa GSK en los ensayos clínicos), de aproximadamente un mes a aproximadamente 4 meses después de recibir la última vacunación, tal como un mes y 4 meses después de ello.

En una realización, la respuesta de anticuerpos es suficiente para proporcionar un riesgo reducido de infección por la malaria y/o un riesgo reducido de malaria clínica en el bebé vacunado.

20 En un aspecto, la invención proporciona el uso de una vacuna para retrasar las infecciones de un bebé por parásitos de la malaria y/o retrasar el desarrollo de síntomas clínicos de malaria. El tiempo hasta el primer episodio de infección por malaria o de malaria clínica puede medirse, por ejemplo, usando un modelo de regresión Cox.

La invención se refiere de forma particular a la reducción de la incidencia de malaria clínica provocada por *P. falciparum*, tal como formas graves y/o leves de la misma. Sin embargo, en un aspecto la invención proporcionó protección contra los síntomas clínicos de malaria no grave.

25 La malaria no grave en el presente documento se define como todos los casos clínicos de malaria que no son graves.

30 Los antígenos del CS usados en la invención pueden usarse junto con otro antígeno que se selecciona a partir de cualquier antígeno que se expresa sobre el esporozoíto o la etapa preeritrocítica del ciclo vital del parásito tal como la etapa hepática, por ejemplo el antígeno-1 (LSA-1) de la etapa hepática, el antígeno-3 (LSA-3) de la etapa hepática, proteína anónima relacionada con tromboespondina (TRAP), proteína superficial del merozoíto-1 (MSP1) la principal proteína superficial del merozoíto, y antígeno del merozoíto apical-1 (AMA-1) que recientemente se ha demostrado que está presente en la etapa hepática (además de en la etapa eritrocítica). Todos estos antígenos son notorios en el campo. El antígeno puede ser toda la proteína o un fragmento inmunógeno del mismo. Los fragmentos inmunógenos de los antígenos de malaria son notorios, por ejemplo el ectodominio de AMA-1.

35 El antígeno de *P. falciparum* está fusionado al antígeno superficial de la hepatitis B (HBsAg). Así, un antígeno proteínico del circumesporozoíto (CS) adecuado para usar en la presente invención está en forma de una proteína de fusión con HBsAg.

En un aspecto la proteína de fusión comprende una secuencia que contiene al menos 160 aminoácidos de la porción del extremo C de la proteína CS y cuatro o más repeticiones en tándem de la región inmunodominante.

40 En una realización la proteína de fusión para usar en la invención es una proteína que comprende una porción de la proteína CS de *P. falciparum* sustancialmente la que corresponde a los aminoácidos 207-395 del clon 3D7 de *P. falciparum*, derivado de la cepa NF54 (Caspers y cols, referencia anterior) fusionado en marco mediante un enlazador lineal al extremo N de HBsAg. El enlazador puede comprender parte o toda la región preS2 de HBsAg.

45 Las construcciones de CS adecuadas para usar en la presente invención se resumen en el documento WO 93/10152. Particularmente adecuada es la proteína híbrida conocida como RTS tal como se describe en el documento WO 93/10152 (en el que se denota RTS*) y el documento WO 98/05355, cuyo contenido completo de ambos se incorporan al presente documento por referencia.

Una proteína de fusión particularmente adecuada es la proteína de fusión conocida como RTS que está constituida por:

- 50
- Un residuo de metionina, codificada por los nucleótidos 1059 a 1061, derivado de la secuencia génica de TDH3 de Sacchromyes cerevisiae. (Musti A.m. y cols Gene 1983 25 133-143).
 - Se usaron tres aminoácidos, Met Ala Pro, derivados de una secuencia de nucleótidos (1062 a 1070) creados mediante el procedimiento de clonado para construir al gen híbrido.

- Un tramo de 189 aminoácidos, codificado por los nucleótidos 1071 a 1637 que representa los aminoácidos 207 a 395 de la proteína circumsporozoíto (CSP) de la cepa 3D7 de *Plasmodium falciparum* (Caspers y cols, referencia anterior).
- 5 • Un aminoácido (Gly) codificado por los nucleótidos 1638 a 1640, creado mediante el procedimiento de clonación que se usa para construir el gen híbrido.
- Cuatro aminoácidos, Pro Val Thr Asn, codificados por los nucleótidos 1641 a 1652, y que representan los cuatro restos del extremo carboxi del virus de la proteína preS2 de la hepatitis B (serotipo adw) (Nature 280: 815-819, 1979).
- 10 • 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).

En una realización la RTS está en forma de partículas inmunógenas de RTS,S.

La construcción RTS,S por ejemplo puede comprender dos polipéptidos RTS y S que se sintetizan de forma simultánea y espontánea a partir de estructuras particuladas compuestas (RTS,S).

15 La proteína RTS preferiblemente se expresa en células de levadura diseñadas genéticamente, más preferiblemente *S. cerevisiae* o *Pichia pastoris*. En dicho huésped, la RTS se expresará en forma de partícula lipoproteínica (también denominada en el presente documento partícula inmunógena o partícula viroide). La cepa de levadura receptora preferida preferiblemente ya porta en su genoma varias copias integradas de un casete de expresión S de la hepatitis B. La cepa resultante sintetiza por lo tanto dos polipéptidos, S y RTS, que de forma espontánea se ensamblan en partículas lipoproteínicas mixtas (RTS,S). Estas partículas, de forma ventajosa presentan las
20 secuencias CSP del híbrido sobre su superficie. De forma ventajosa, la proporción entre de RTS: S en estas partículas mixtas es, por ejemplo 1:4.

Se cree que la presencia del antígeno superficial de la Hepatitis B y la formación de las partículas RTS,S refuerza la capacidad inmunógena de la porción de proteína CS de la proteína híbrida, ayuda a la estabilidad y/o ayuda a una fabricación reproducible de la proteína.

25 Aunque no se desea comprometerse con la teoría, se cree que los extremos N y C y los fragmentos de la repetición central pueden incluir varios epítomos de los linfocitos T y B.

En las proteínas recombinantes a menudo se introducen aminoácidos no naturales en el proceso de la clonación y se observan en la proteína expresada final. Por ejemplo pueden insertarse diversos aminoácidos tal como 1, 2, 3, 4 ó 5 al inicio (extremo N) de la proteína. Si se insertan 4 aminoácidos al inicio de la proteína, pueden ser por ejemplo
30 MMAP. Además, o de forma alternativa pueden insertarse 1, 2, ó 3 tal como 1 aminoácido en el cuerpo/en medio de la proteína, con la condición de que la actividad y las propiedades, tales como la capacidad inmunógena, de la proteína no se vean afectadas adversamente.

El uso de la vacuna contra la malaria que se describe en este documento también pueden combinarse con otra u otras vacunas que se administran habitualmente a los bebés de menos de 1 año de edad, por ejemplo para
35 proporcionar protección contra uno o más de los siguientes: difteria, tétanos, tos ferina, sarampión, polio oral y/o Hepatitis B. Por ejemplo dichas vacunas pueden administrarse a una edad de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 meses según sea apropiado tal como 6, 10 y 14 semanas. En un aspecto, dicha vacuna que se proporciona para bebés es DTPw-Hib opcionalmente con una vacuna de polio oral.

40 La vacuna contra la malaria de acuerdo con la invención también puede usarse combinada con una vacuna de BCG, que se administra por ejemplo 1, 2 o más semanas antes de la vacuna de la invención.

Las vacunas tales como la vacuna de la polio oral, BCG y/o Hepatitis B pueden administrarse a aproximadamente 1 semana o menos después del nacimiento.

45 Cuando la vacuna contra la malaria de la invención se administra junto con otra u otras vacunas para bebés, entonces las vacunas pueden administrarse de forma simultánea o con aproximadamente 15, 20, 25 o más días entre ellas. Esto puede evitar cualquier interacción adversa de las dos o más vacunas.

La divulgación también se refiere a un procedimiento de tratamiento que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna tal como se describe en el presente documento, a bebés para proporcionar protección contra la infección y/o contra el desarrollo de malaria clínica.

50 Un calendario de vacunación adecuado para usar en la invención incluye la administración de 3 dosis de vacuna, con intervalos de un mes. En las realizaciones alternativas de la invención se emplean una, dos, tres o más dosis que se administran con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más semanas de diferencia. Puede emplearse el refuerzo de las mismas para complementar la anterior tanda primaria de vacunación.

También puede ser apropiado usar una buena práctica general para la prevención de malaria junto con la vacuna contra la malaria que se describe en el presente documento. La mejor práctica incluiría prácticas tales como pulverizar las habitaciones, etc. con insecticidas y/o emplear una red sobre la cama para reducir la exposición del individuo a los mosquitos. En el ensayo 038 se usaron dichas prácticas junto con la vacuna contra la malaria basada en RTS,S.

5

Como criterio de valoración primario en el ensayo 038, puede requerirse que los episodios clínicos de malaria por ejemplo presenten parasitemia asexual por *P. falciparum* superior a 500 o superior a 0 por μ l en películas de sangre gruesas teñidas con Giemsa y presencia de fiebre (temperatura $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$).

10

La definición de malaria grave, por ejemplo puede incluir la presencia de uno o más de los siguientes: anemia por malaria grave (PCV $<15\%$), malaria cerebral (valoración de coma según la escala de Blantyre <2) o enfermedad grave de otros sistemas corporales que podrían incluir ataques múltiples (dos o más convulsiones generalizadas en las 24 horas anteriores), postración (definida como incapacidad de sentarse sin ayuda), hipoglucemia $<2,2\text{mmol/dl}$ o $<40\text{mg/dl}$), presunta acidosis clínica o colapso circulatorio. Estos se incluyen en la Tabla 1 más adelante.

| | | |
|---------------------------------|--|---|
| Anemia por malaria grave | <ul style="list-style-type: none"> • Lectura definitiva de la parasitemia asexual • Hematocrito $<15\%$ • Ninguna otra causa más probable de enfermedad | |
| Malaria cerebral | <ul style="list-style-type: none"> • Lectura definitiva de la parasitemia asexual • Valoración de coma ≤ 2 • Ninguna otra causa identificable de pérdida de conciencia | Evaluar la valoración del coma tras la corrección de la hipoglucemia y 60 minutos después del control de los ataques. Si los ataques no pueden controlarse en 30 minutos, se incluye al niño |
| Malaria grave (otros) | <ul style="list-style-type: none"> • Lectura definitiva de la parasitemia asexual • Ninguna otra causa más probable de enfermedad • No cumple los criterios de anemia por malaria grave o malaria cerebral • Uno de los siguientes: <ul style="list-style-type: none"> - Ataques múltiples - Postración - Hipoglucemia - Acidosis - Colapso circulatorio | Dos o más convulsiones generalizadas en un periodo de 24 horas antes de la admisión Incapacidad de sentarse sin ayuda $<2,2\text{ mmol/dl}$ o $<40\text{mg/dl}$ Signos y/o resultados de laboratorio que lo apoyen Signos y/o resultados de laboratorio que lo apoyen |

15

De acuerdo con la invención, puede usarse una solución acuosa de proteína híbrida purificada directamente y combinada con un adyuvante o vehículo adecuado. De forma alternativa, la proteína puede liofilizarse antes de mezclar con un adyuvante o vehículo adecuado.

20

Una dosis de vacuna adecuada de acuerdo con la invención está entre 1-100 μg de antígeno por ejemplo RTS,S por dosis, tal como 5 a 75 μg de antígeno por ejemplo RTS,S, en particular una dosis de 25 μg de antígeno por ejemplo proteína RTS,S, por ejemplo en 250 a 500 μl (formulación líquida final).

Una dosis particularmente adecuada de antígeno para las formulaciones pediátricas de acuerdo con la invención es 25 μg , por ejemplo en un volumen final de 0,5 ml.

El antígeno se combina con un adyuvante o vehículo que comprende una combinación de 3D-MPL y QS21.

En particular el adyuvante es un estimulador preferente de una respuesta de tipo Th1.

25

Los adyuvantes adecuados incluyen, pero sin limitación, lípido A desintoxicado de cualquier fuente y derivados no tóxicos de lípido A, saponinas y otros inmunoestimulantes que son estimuladores preferentes de una respuesta celular Th1 (también denominada respuesta de tipo Th1 en el presente documento).

Una respuesta inmunitaria puede dividirse de forma en líneas generales en dos categorías extremas, siendo una respuesta inmunitaria humoral o mediada por células (caracterizada tradicionalmente por linfocitos B que producen

anticuerpos específicos de antígenos y linfocitos T que actúan como efectores celulares de protección específicos de antígeno: la respuesta de tipo TH1 (que favorece las respuestas inmunitarias mediadas por células) y la respuesta de tipo TH2 (que favorece la inducción de respuestas de anticuerpos).

5 Las respuestas inmunitarias de tipo TH1 extremas pueden caracterizarse por la generación de linfocitos T citotóxicos con haplotipo restringido, y respuestas de linfocitos citolíticos naturales específicos de antígeno. En los ratones, las respuestas de tipo TH1 se caracterizan a menudo por la generación de anticuerpos del subtipo IgG2a, mientras que en el ser humano corresponden a los anticuerpos de tipo IgG1. Las respuestas inmunitarias de tipo TH2 se caracterizan por la generación de un abanico de isotipos de inmunoglobulinas que incluyen IgG1 en ratones.

10 Puede considerarse que el impulso detrás del desarrollo de estos dos tipos de respuestas inmunitarias son las citocinas. Los niveles elevados de citocinas de tipo TH1 tienden a favorecer la inducción de las respuestas inmunitarias mediadas por células contra el antígeno dado, aunque los niveles elevados de citocinas de tipo TH2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias humorales contra el antígeno.

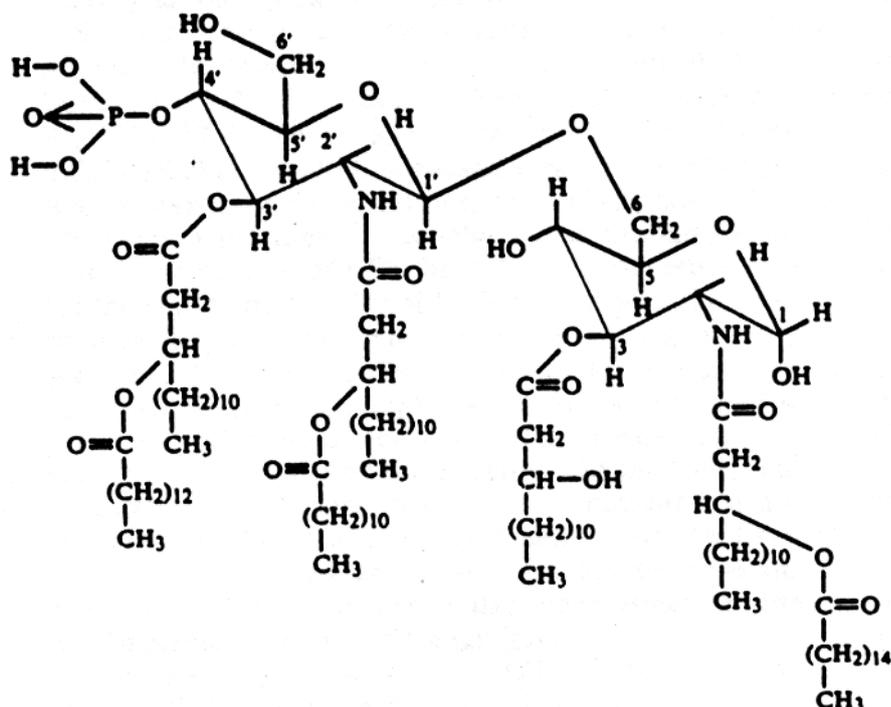
15 La distinción entre respuestas inmunitarias de tipo TH1 y TH2 no es absoluta, y puede ser progresiva entre estos dos extremos. En realidad, un individuo mostrará una respuesta inmunitaria que se describe como que es predominantemente TH1 o predominantemente TH2. Sin embargo, a menudo es conveniente considerar las familias de citocinas en términos de lo que se describe en los clones de linfocitos T murinos positivos para CD4 en Mosmann y Coffman (*Mosmann, T.R. y Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, páginas 145-173*). Tradicionalmente, las respuestas de tipo TH1 se asocian a la producción de citocinas INF- γ por los linfocitos T. Otras citocinas asociadas a
20 a menudo directamente a la inducción de respuestas inmunitarias de tipo TH1 no son producidas por los linfocitos T, tales como IL-12. Por el contrario, las respuestas de tipo TH2 se asocian a la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y el factor de necrosis tumoral - β (TNF- β).

25 Se sabe que ciertos adyuvantes de vacunas están particularmente adecuados a la estimulación de respuestas de citocinas de tipo TH1 o TH2. Tradicionalmente los indicadores del equilibrio entre TH1:TH2 de la respuesta inmunitaria después de una vacunación o infección incluye la medición directa de la producción de citocinas TH1 o TH2 por los linfocitos T *in vitro* después de la restimulación con antígeno, y/o las mediciones (al menos en ratones) de la proporción entre IgG1:IgG2a de las respuestas de anticuerpos específicas de antígeno.

30 Así, un adyuvante de tipo TH1 es aquel que estimula las poblaciones de linfocitos T aisladas para producir niveles elevados de citocinas de tipo TH1 cuando se restimulan con antígeno *in vitro*, e induce respuestas inmunoglobulinas específicas de antígeno asociadas al isotipo de tipo TH1.

Los adyuvantes que son capaces de una estimulación preferencial de la respuesta de linfocitos TH1 se describen en los documentos WO 94/00153 y WO 95/17209.

35 Se ha sabido desde hace tiempo que el lipopolisacárido enterobacteriano (LPS) es un estimulador potente del sistema inmunitario, aunque su uso en adyuvantes ha sido restringido debido a sus efectos tóxicos. Un derivado no tóxico de LPS, monofosforil lípido A (MPL), producido por la eliminación del grupo carbohidrato nuclear y el fosfato de la glucosamina terminal reductora, ha sido descrito por Ribi y cols (1986, *Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins*, Plenum Publ. Corp., NY, páginas 407-419) y tiene la siguiente estructura:



Una versión desintoxicada adicional de MPL se obtiene por la eliminación de la cadena acilo de la posición 3 del esqueleto de disacárido y se denomina monofosforil lípido A 3-O-desacilado (3D-MPL). Puede purificarse y prepararse por los procedimientos que se enseñan en el documento GB 2122204B, cuya referencia también describe la preparación de difosforil lípido A, y de sus variantes 3-O-desaciladas.

Una forma preferida de 3D-MPL está en forma de una emulsión que tiene un tamaño de partícula pequeño de menos de 0,2µm de diámetro y su procedimiento de fabricación se describe en el documento WO 94/21292. Las formulaciones acuosas que comprenden monofosforil lípido A y un tensioactivo se han descrito en el documento WO 98/43670.

Los adyuvantes derivados de lipopolisacárido bacteriano pueden purificarse y procesarse a partir de fuentes bacterianas, o de forma alternativa pueden ser sintéticas. Por ejemplo, el monofosforil lípido A purificado se describe en Ribi y cols 1986 (referencia anterior), y monofosforil o difosforil lípido A 3-O-desacilado derivado de *Salmonella* sp. se describe en los documentos GB 2220211 y US 4912094. Se han descrito otros lipopolisacáridos purificados y sintéticos (Hilgers y cols., 1986, *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 79(4):392-6; Hilgers y cols., 1987, *Immunology*, 60(1):141-6; y EP 0 549 074 B1).

Las saponinas son adyuvantes notorios y se enseñan en: Lacaille-Dubois, M y Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* vol 2 páginas 363-386). Por ejemplo, Quil A (derivado de la corteza de el árbol sudamericano Quillaja Saponaria Molina), y sus fracciones, se describen en el documento US 5.057.540 y Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1996, 12 (1-2):1-55; 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 potentes adyuvantes sistémicos, y el procedimiento para su producción se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.057.540 y el documento EP 0 362 279 B1. También se describe en estas referencias el uso de QS7 (una fracción no hemolítica de Quil-A) que actúa como adyuvante potente para las vacunas sistémicas. El uso de QS21 se describe adicionalmente en Kensil y cols. (1991. *J. Immunology* vol 146, 431-437). También se conocen combinaciones de QS21 y polisorbato o ciclodextrina (documento WO 99/10008). Los sistemas adyuvantes en partículas que comprenden las fracciones de QuilA, tal como QS21 y QS7 se describen en los documentos WO 96/33739 y WO 96/11711.

Otro inmunostimulante es un oligonucleótido inmunostimulador que contiene dinucleótidos CpG no metilados ("CpG"). CpG es una abreviatura de motivos de dinucleótidos de citosina y guanósina presentes en el ADN. En la técnica se conocen los CpG como adyuvante cuando se administra tanto por vía sistémica como mucosa (documentos WO 96/02555, EP 468520, Davis y cols., *J. Immunol*, 1998, 160(2):870-876; McCluskie y Davis, *J. Immunol.*, 1998, 161(9): 4463-6). Históricamente, se observó que la fracción de ADN de BCG podía ejercer un efecto antitumoral. En estudios posteriores, se demostró que los oligonucleótidos sintéticos derivados de las secuencias del gen de BCG podían inducir efectos inmunostimuladores (tanto *in vitro* como *in vivo*). Los autores de estos estudios concluyeron que ciertas secuencias palindrómicas, que incluyen un motivo CG central, portaban esta actividad. El papel central del motivo CG en la inmunostimulación se dilucidó posteriormente en una publicación de Krieg,

Nature 374, página 546 1995. El análisis detallado ha demostrado que el motivo CG tiene que estar en un cierto contexto en la secuencia, y que dichas secuencias son habituales en el ADN bacteriano pero son infrecuentes en el ADN de vertebrados. La secuencia inmunoestimuladora es a menudo: Purina, Purina, C, G, pirimidina, pirimidina; en la que el CG no está metilado, pero se sabe que otras secuencias de CpG no metiladas son inmunoestimuladoras y que pueden usarse en la presente invención.

En ciertas combinaciones de los seis nucleótidos, está presente una secuencia palindrómica. Varios de estos motivos, ya sea en forma de repeticiones de un motivo o una combinación de diferentes motivos, puede estar presente en el mismo oligonucleótido. La presencia de una o más de estas secuencias inmunoestimuladoras que contienen oligonucleótidos puede activar diversos subconjuntos inmunitarios, que incluyen linfocitos citolíticos naturales (que producen interferón γ y tienen actividad citolítica) y macrófagos (Wooldrige y cols Vol 89 (n.º 8), 1977). También se ha demostrado que otras secuencias que contienen CpG no metilado que no tienen esta secuencia consenso son inmunomoduladoras.

Cuando CpG se formula en una vacuna, generalmente se administra en solución libre junto con antígeno libre (documento WO 96/02555; McCluskie y Davis, referencia anterior) o conjugado covalentemente a un antígeno (documento WO 98/16247), o formulado con un vehículo tal como hidróxido de aluminio ((antígeno superficial de la Hepatitis) Davis y cols. referencia anterior; Brazolot-Millan y cols., *Proc.Natl.Acad.Sci.*, USA, 1998, 95(26), 15553-8).

Dichos inmunoestimulantes descritos anteriormente pueden formularse junto con vehículos, tales como por ejemplo liposomas, emulsiones de aceite en agua, y/o sales metálicas, que incluyen sales de aluminio (tal como hidróxido de aluminio). Por ejemplo, también puede formularse 3D-MPL con hidróxido de aluminio (documento EP 0 689 454) o en emulsiones de aceite en agua (documento WO 95/17210); QS21 puede formularse de forma ventajosa con liposomas que contienen colesterol (documento WO 96/33739), emulsiones de aceite en agua (documento WO 95/17210) o alumbre (documento WO 98/15287); CpG puede formularse con alumbre (Davis y cols. referencia anterior ; Brazolot-Millan referencia anterior) o con otros vehículos catiónicos.

También se desvelan las combinaciones de inmunoestimulantes, en particular una combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina (documentos WO 94/00153; WO 95/17210; WO 96/33739; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241), más particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL tal como se describe en el documento WO 94/00153.

Un sistema potenciado incluye la combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina en particular la combinación de QS21 y 3D-MPL tal como se describe en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactógena en la que QS21 se inactiva en liposomas que contienen colesterol (DQ) tal como se describe en el documento WO 96/33739.

Una formulación adyuvante particularmente potente que incluye QS21, 3D-MPL & tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210 y es otra formulación preferida para usar en la invención.

Otra formulación preferida comprende un oligonucleótido CpG solo o junto con QS21, 3D-MPL o junto una sal de aluminio.

En una realización la invención emplea además una emulsión de aceite en agua o liposomas. Las combinaciones de adyuvantes adecuadas para usar en la presente invención son:

1. 3D-MPL, QS21 y una emulsión de aceite en agua.
2. 3D-MPL y QS21 en una formulación en liposomas.
3. 3D-MPL, QS21 y CpG en una formulación en liposomas.

La cantidad de 3D-MPL que se usa es generalmente pequeña, pero dependiendo de la formulación de vacuna puede estar en el entorno de 1-1000 μg por dosis, generalmente 1-500 μg por dosis, tal como entre 1 y 100 μg por dosis (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 o 90 μg por dosis).

La cantidad de saponina para usar en los adyuvantes de la presente invención puede estar en el entorno de 1-1000 μg por dosis, generalmente 1-500 μg por dosis, más tal como 1-250 μg por dosis, y más específicamente entre 1 y 100 μg por dosis (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 o 90 μg por dosis).

La cantidad de CpG u oligonucleótidos inmunoestimuladores en los adyuvantes o vacunas de la presente invención es generalmente pequeña, pero dependiendo de la formulación de vacuna puede estar en el entorno de 1-1000 μg por dosis, generalmente 1-500 μg por dosis, y más tal como entre 1 y 100 μg por dosis (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 o 90 μg por dosis).

En un aspecto de la invención, la dosis tiene un volumen final de 0,5 ml.

Las vacunas de la invención pueden proporcionarse mediante cualquiera de una variedad de vías tal como oral, tópica, subcutánea, mucosa), intravenosa, intramuscular, intranasal, sublingual e intradérmica.

La inmunización puede ser profiláctica o terapéutica. La invención que se describe en el presente documento se refiere principalmente pero no de forma exclusiva con la vacunación profiláctica contra la malaria, de forma más particular con la vacunación profiláctica para prevenir o reducir la probabilidad de infección por la malaria y/o enfermedad de la malaria.

5 Los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados para usar en la invención son notorios en la técnica e incluyen por ejemplo agua o tampones. La preparación de vacuna se describe de forma general en Pharmaceutical Biotechnology, Vol. 61 Vaccine Design - the subunit and adjuvant approach, editado por Powell y Newman, Plenum Press Nueva York, 1995. New Trends and Developments in Vaccines, editado por Voller y cosl., University Park Press, Baltimore, Maryland, EE. UU., 1978. La encapsulación en liposomas se describe, por ejemplo, en Fullerton, patente de Estados Unidos 4.235.877. La conjugación de proteínas con macromoléculas se describe, por ejemplo, en Likhite, patente de Estados Unidos 4.372.945 y en Armor y cols., patente de Estados Unidos 4.474.757.

En el contexto de esta memoria descriptiva "que comprende" debe interpretarse como que incluye.

Ejemplo

15 Diseño del estudio

El estudio se realizó en el Centro de Investigaçãõ em Saude de Manhiça (CISM, Manhiça Health Research Centre) entre junio de 2005 y marzo de 2007, en Ilha Josina y Tanninga, dos comunidades aproximadamente 50 km al norte de la ciudad de Manhiça, donde está emplazada la sede de CISM. Las características de área de estudio global y de Ilha Josina han sido descritos anteriormente (Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Milman J, y cols. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against Plasmodium falciparum infection and disease in young African children: randomised controlled trial. Lancet 16 de octubre de 2004 16-22; 364(9443): 1411-20). Tanninga es una comunidad rural en frente de Ilha Jossina justo a otro lado de la llanura aluvial del río Incomati. El clima es subtropical con dos estaciones diferentes: una estación caliente y lluviosa desde noviembre a abril y una estación generalmente fresca y más seca durante el resto del año. La transmisión de la malaria es perenne con alguna estacionalidad y en su mayor parte atribuible a *P. falciparum*. *Anopheles funestus* es el vector principal. El tratamiento combinado basado en amodiaquina y sulfadoxina-pirimetamina fue el tratamiento de primera línea para la malaria sin complicaciones hasta septiembre de 2006 cuando se cambió a un tratamiento combinado basado en artemisinina (ACT) usando artesunato y sulfadoxina-pirimetamina. Desde 2005, se han realizado rondas anuales de pulverización residual de interiores (IRS) como parte de las actividades de control de la malaria del Ministerio de sanidad. Durante la primera ronda en diciembre de 2005, la IRS se basaba en carbamatos (ICON®) pero se cambió a DDT en diciembre de 2006. Como parte de las actividades del estudio y de acuerdo con las recomendaciones nacionales, se administró una mosquitera tratada con insecticida (ITN) a las mujeres embarazadas durante el procedimiento de selección, junto con las instrucciones para su uso. Tanto Ilha Josina como Tanninga tienen centros de salud y maternidades que proporcionan atención médica curativa y preventiva básica. Para el estudio, se mejoraron las instalaciones, se proporcionó atención médica 24 horas al día y se proporcionó transporte para trasladarse al Manhica District Hospital, adyacente al CISM.

El estudio fue un ensayo controlado aleatorio de doble ciego de fase I /IIb para evaluar la seguridad, capacidad inmunógena y prueba de eficacia de la vacuna contra la malaria candidato RTS,S/AS02D cuando se administraba a bebés mediante inmunizaciones administradas a las 10, 14 y 18 semanas de edad. El protocolo fue aprobado por el Comité de bioética nacional de Mozambique, el Comité de revisión ética del Hospital clínico de Barcelona y el Comité de protección de seres humanos PATH. El número de registro del ensayo es NCT00197028 y el número de IND es BB-IND 10514. El ensayo se emprendió de acuerdo con las directrices de Buena práctica clínica de la Conferencia internacional de armonización y fue controlado por GSK Biologicals. Un Control de seguridad local y una Junta de control de seguridad revisaron el diseño, realización y resultados del ensayo.

45 Participantes

El CISM funciona como sistema de supervisión demográfica aproximadamente en la mitad del distrito que incluye ambas localizaciones del estudio. Se pidió a las mujeres embarazadas en el tercer trimestre de embarazo, residentes en el área de estudio, que considerarían incluir a sus bebés, que participaran en el procedimiento de consentimiento informado. En la primera visita, se leyó una hoja informativa y se fue explicada a grupos de mujeres embarazadas por personal formado especialmente. Lo que querían los inventores era un consentimiento individual sólo después de que las mujeres aprobaran una prueba de comprensión oral individual diseñada para comprobar que se había entendido la información. Se les invitó a firmar (o imprimir su huella dactilar si no sabían escribir) el documento de consentimiento informado. Un miembro de la comunidad, no asociado al estudio de investigación, actuó como testigo imparcial y firmó el formulario de consentimiento. Las que dieron su consentimiento informado recibieron orientación y se les realizaron análisis para determinar si eran positivas para VIH (Determine™ HIV1-2, Abbot Laboratories y UNI-GOLD VIH, Trinity Biotech PLC) y Hepatitis B (Determine™ HBsAg, Abbot Laboratories). Las mujeres que se encontró que eran positivas para VIH se derivaron a los servicios sanitarios gubernamentales del Hospital del distrito de Manhiça para su evaluación médica y tratamiento según las directrices nacionales. Éstas incluían reducción de la transmisión de madre a hijo así como aprovisionamiento gratuito de tratamiento con antiretrovirales a las que cumplían los criterios clínicos y sociales. Las madres positivas para la hepatitis B recibieron

asesoramiento sobre el riesgo de transmisión a su descendencia y se les ofreció la vacuna contra la hepatitis B al nacimiento para el recién nacido.

Tras otro consentimiento informado de la madre, y usando procedimientos similares a los que se describen anteriormente, se realizó un cribado de los bebés de entre 6 y 12 semanas de edad. Este incluyó una historia médica breve y examen físico y toma de muestras de sangre mediante punción del talón para realizar las pruebas de hematología, bioquímica e inmunología iniciales. Los criterios de inclusión incluían, entre otros, un periodo de gestación normal y ausencia de anomalías médicas obvias. Debido a que los niños nacidos de madres positivas para hepatitis B y VIH presentaban un alto riesgo de adquisición neonatal de los virus, no se incluyeron en el ensayo. Entre otros criterios, se excluyó a los niños de la participación si no se administraba BCG al menos una semana antes de iniciar la vacunación del estudio o si se les habían administrado otras vacunaciones, distintas de la primera dosis de OPV al nacimiento con BCG, antes de su inclusión.

Poco después de la inclusión se proporcionó una tarjeta de identificación con fotografía. Esta incluía el nombre del niño y la madre así como el número de identificación personal del censo (Alonso P, Saute F, Aponte JJ. Manhiça DSS, Mozambique. In: Sankoh OA, Ngom P, Nyarko P, Mwageni E, Kahn K, editores. Population and health in developing countries; vol.1, population, health and survival at INDEPTH sites. Ottawa: International development research center (IDRC); 2002. páginas189-95) y se asignó un número de estudio único en la visita de selección. Las actividades de campo se iniciaron el 24 de junio de 2005. El primer bebé se admitió el 23 de agosto de 2005 y el último el 12 de septiembre de 2006. Las actividades de seguimiento para la fase de doble ciego se completaron el 6 de marzo de 2007, cuando el último niño seleccionado alcanzó su visita del estudio del 6º mes.

Procedimientos

El EPI en Mozambique incluye la vacuna de BCG y la vacuna de polio oral (OPV) al nacer, tres dosis de difteria-tétanos-tos ferina de células enteras (DTPw) y vacunas de hepatitis B, coadministradas con la OPV a las 8, 12 y 16 semanas de edad y la vacuna de sarampión a los 9 meses de edad. Para los fines del estudio, los presentes inventores introdujeron dos cambios en este esquema. Dado que el uso la vacuna de Hib se está expandiendo rápidamente y está formando parte del EPI en un número de países africanos cada vez mayor, los presentes inventores decidieron incluirla combinada con DTPw ya que proporcionaría un beneficio adicional a los niños que participaban en el ensayo. La vacuna contra la hepatitis B no se administró junto con DTPw ya que se había demostrado que RTS,S inducía valoraciones comparables contra HBsAg. La Figura 1a representa el diseño del ensayo y el esquema de seguimiento. Los niños elegibles se incluyeron el día de la primera vacunación con DTPw/Hib [TETRActHib™ Aventis Pasteur]. Los niños se asignaron aleatoriamente, en el momento de la primera vacunación con DTPw/Hib, para recibir tres dosis de RTS,S/AS02D (GSK Biologicals, Rixensart, Bélgica) o vacuna contra la hepatitis B (Engerix-B™, GSK Biologicals, Rixensart, Bélgica) escalonadas cada 2 semanas con las vacunas DTPw/Hib y OPV y administradas a las 10, 14 y 18 semanas de edad. La aleatorización del bloque se realizó en GSK Biologicals con el programa SAS versión 8 (proporción 1:1, tamaño del bloque de 2). El código de la aleatorización se hizo público para los investigadores una vez se habían controlado, limpiado y cerrado las bases de datos.

Los bebés asignados de forma aleatoria al grupo de formulación pediátrica de la vacuna contra la malaria recibieron 0,5 ml de la formulación RTS,S/AS02D que contenía 25 µg de RTS,S y el sistema adyuvante AS02D. RTS,S es una proteína recombinante híbrida formada por la repetición en tándem central de la proteína CS *P. falciparum* y regiones del extremo carboxi fusionadas al extremo amino del antígeno S del virus de la hepatitis B (HBsAg). Las proteínas se autoensamblan formando una partícula que también incluye antígeno S no fusionado. El antígeno y el sistema adyuvante AS02D registrado de GlaxoSmithKline se describen en detalle en otros documentos (Macete EV, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Navia MM, Milman J, y cols. Evaluation of two formulations of adjuvanted RTS, S malaria vaccine in children aged 3 to 5 years living in a malaria-endemic region of Mozambique: a Phase I/IIb randomized double-blind bridging trial. *Trials* 26 de marzo de 2007; 8: 11).

Se administró DTPw/Hib por vía intramuscular (IM) en el muslo derecho anterolateral mientras que RTS,S/AS02D o Engerix-B™ se administraron por vía IM en el muslo izquierdo anterolateral. La vacunación RTS,S/AS02D o Engerix-B™ se administró en forma de doble ciego (observador ciego, participante ciego). El equipo de vacunación preparó la vacuna y ocultó el contenido de la jeringuilla con cinta opaca antes de proporcionar la jeringuilla al equipo médico para la inmunización del bebé. Dado que las dos vacunas que se usaron en el estudio eran de aspecto distinto, el equipo de vacunación no era ciego y no estuvo implicado en ningún otro procedimiento del estudio.

Después de cada vacunación, se observó a los bebés durante al menos una hora. Trabajadores de campo formado visitó a los niños en casa todos los días durante los siguientes seis días para registrar cualquier evento adverso (AE). Durante este periodo, se registraron los eventos adversos locales y generales solicitados. Los eventos adversos no solicitados se registraron durante 30 días después de cada dosis a través del sistema de supervisión de morbilidad con base en el centro de salud. Los eventos adversos graves (SAE) se detectaron de forma similar y se registraron durante todo el estudio. Una descripción detallada de las definiciones de eventos adversos solicitados y no solicitados así como de los SAE puede encontrarse en otros documentos¹¹. Se realizó una evaluación adicional de la seguridad mediante evaluaciones hematológicas y bioquímicas, que incluían la función renal y hepática medidas en varios tiempos tal como se muestra en la Figura 1a. Las valoraciones de anticuerpos contra HBsAg se

midieron al inicio y un mes después a la dosis 3 de RTS,S/AS02D o Engerix-B™. Las valoraciones de anticuerpos contra CS se midieron al inicio, y uno y tres meses y medio después de la dosis 3 de RTS,S/AS02D o Engerix-B™. Se midieron los anticuerpos contra las toxinas de la difteria y tétanos y polirribosil ribitol fosfato (PRP) para *H. influenzae* de tipo b un mes después de la dosis 3 de DTPw/Hib. Los anticuerpos contra *B. pertussis*, se midieron al inicio y un mes después de la 3ª dosis de DTPw/Hib.

Los casos de infección con malaria por *P. falciparum* se controlaron mediante detección activa de la infección (ADI) y mediante detección pasiva de los casos (PCD) en los centros de salud del área de estudio. La ADI consistía en visitas repetidas a los participantes del estudio a intervalos predefinidos (Figura 1a). En cada visita se recogía un porta con sangre para determinar la parasitemia independientemente de la presencia o ausencia de síntomas, y se registraba la temperatura axilar. Los niños con portas positivos se trataron con el tratamiento de primera línea independientemente de la presencia de síntomas y se excluyeron de evaluaciones posteriores de la ADI. Antes de iniciar el seguimiento de la ADI, presumiblemente se eliminó la parasitemia asintomática en todos los niños con una combinación de amodiaquina (10 mg/kg/día durante 3 días) y una única dosis de sulfadoxina-pirimetamina (sulfadoxina 25 mg/kg y pirimetamina 1,25 mg/kg) administradas dos semanas antes de las dosis tercera y final de RTS,S/AS02D o Engerix-B™. Se comprobó la parasitemia 2 semanas después en el momento de la tercera dosis y, si la había, se trató con tratamiento de segunda línea basado en Coartem®. Sólo los niños sin parasitemia iniciaron la ADI, que comenzó 2 semanas después de la tercera dosis de RTS,S/AS02D o Engerix-B™ y se realizó en semanas alternativas durante 12 semanas.

El sistema de supervisión de la morbilidad con base en el centro de salud que se estableció en el Hospital del distrito de Manhíça, en los centros de salud de Ilha Josina y Tanninga, permitió la detección pasiva de los casos (PCD) de todas las veces que se acudía a centros de salud y establecer los episodios de malaria clínica. Este sistema de supervisión se ha descrito en detalle en otros documentos (Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Milman J, y cols. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against Plasmodium falciparum infection and disease in young African children: randomised controlled trial. Lancet 16 de octubre de 2004 16-22; 364(9443): 1411-20). En resumen, los tres centros contaban con equipo médico las 24 horas formado para identificar los participantes del estudio a través de la tarjeta de identificación personal y para asegurarse de una evaluación, manejo y documentación estandarizada durante todo el seguimiento. A todos los niños con fiebre documentada (37,5°C o más) o historia de fiebre en las 24 horas anteriores o palidez se les extraía sangre para determinar parásitos y hematocrito (PCV). Los niños que cumplían con los criterios de admisión se derivaban al Hospital del distrito de Manhíça para su hospitalización. El tratamiento clínico se proporcionaba de acuerdo con directrices nacionales estándar. Al ser admitidos y en el alta se registraba toda la información relevante en formularios estandarizados.

Para determinar la presencia de parásitos y la densidad de las etapas asexuales de *P. falciparum*, se leyeron portas de sangre teñidas con Giemsa siguiendo los procedimientos de control de calidad estándar que se describen en otros documentos (Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Milman J, y cols. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against Plasmodium falciparum infection and disease in young African children: randomised controlled trial. Lancet 16 de octubre de 2004 16-22; 364(9443): 1411-20). Los parámetros bioquímicos se midieron usando un fotómetro de bioquímica en seco VITROS DT II (Orto Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson Company, EE. UU.). Las pruebas hematológicas se realizaron usando un hemocitómetro Sysmex KX-21N (Sysmex Corporation Kobe, Japón). El PCV se midió en tubos microcapilares heparinizados usando un lector de hematocrito Hawksley después de centrifugar.

Los anticuerpos específicos para el epítipo de repetición en tándem de la proteína CS se midieron mediante un ELISA estándar usando placas absorbidas con el antígeno recombinante R32LR que contiene la secuencia [NVDP(NANP)15]2LR. El corte del ensayo se fijó a 0,5 UE/ml. Los niveles de anticuerpos contra HBsAg se midieron usando un radioinmunoensayo comercial (AUSAB, Abbott) con un corte del ensayo fijado a 10 UI/ml. Los anticuerpos contra PRP se midieron mediante ELISA con un corte del ensayo fijado a 0,15 µg/ml. Las valoraciones de anticuerpo contra la difteria y contra el tétanos se midieron mediante ELISA con un corte del ensayo fijado a 0,10 UI/ml. Las valoraciones de anticuerpos contra B. Pertussis en célula entera se determinaron mediante ELISA (Labsystems) con un corte del ensayo fijado a 15 UEL/ml.

Análisis estadístico

Los criterios de valoración primarios del ensayo eran la seguridad y tolerabilidad de la vacuna candidato RTS,S/AS02D. Todos los niños que recibieron al menos una dosis de DTPw/Hib se incluyeron en el análisis de seguridad del grupo de intención de tratamiento (ITT).

Los datos de los anticuerpos contra CS y contra HBsAg se resumieron mediante medias geométricas de las valoraciones (GMT) con IC del 95%. La seropositividad contra CS se definió como $\geq 0,5$ UE/ml, mientras que la seroprotección de la hepatitis B se definió como ≥ 10 UI/ml.

La prueba de concepto de eficacia de la vacuna (VE) se basó en un Plan de información y análisis (RAP) definido de forma prospectiva realizado en una cohorte de acuerdo con el protocolo (ATP). La cohorte de ATP incluía sujetos que cumplían todos los criterios de elegibilidad, completaron la tanda de vacunación e hicieron el seguimiento durante el periodo de ADI. El análisis incluyó todas las primeras o únicas infecciones asexuales por *P. falciparum*

detectadas durante el periodo de seguimiento que se iniciaba 14 días después de la dosis 3 de RTS,S/AS02D o Engerix-B™ y que terminaba con la visita en el mes 6 del estudio (aproximadamente un seguimiento de 3 meses). Las infecciones por malaria incluidas en este análisis se detectaron mediante ADI o PCD.

5 El análisis exploratorio ulterior consideró la eficacia de la vacuna contra la malaria clínica en una cohorte de ITT que incluía el primer o el único episodio desde el momento de la inclusión hasta la fecha en la que el último bebé incluido completó su seguimiento por ADI (6 de marzo de 2007). Además, se realizaron análisis exploratorios de malaria clínica en la misma cohorte de ATP y periodo de seguimiento que en la evaluación de la eficacia de nuevas infecciones. La definición de caso primario para la malaria clínica era la fiebre (temperatura axilar $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$) con una parasitemia asexual de *P. falciparum* de 500 o más por microlitro. Esta definición tiene una sensibilidad y especificidad reseñada superior al 90% (Saute F, Aponte J, Almeda J, Ascaso C, Abellana R, Vaz N, y cols. Malaria in southern Mozambique: malariometric indicators and malaria case definition in Manhica district. Trans R Soc Trop Med Hyg Nov-Dec de 2003;97(6): 661-6). Otros análisis de exploración de la eficacia usaron definiciones de casos secundarios para la malaria clínica que incluían fiebre o una historia de fiebre en las 24 horas anteriores más cualquier parasitemia asexual de *P. falciparum*. El tiempo de riesgo, expresado en términos de años por persona en riesgo (PYAR), se ajustó para las ausencias del área de estudio y para el uso de fármacos contra la malaria tal y como se ha descrito anteriormente (Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Milman J, y cols. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against Plasmodium falciparum infection and disease in young African children: randomised controlled trial. Lancet 16-22 de octubre de 2004; 364(9443):1411-20), ya que estos son periodos de tiempo en los que no podría esperarse que los bebés contribuyeran a los criterios de valoración del estudio.

10 VE se definió como 1 menos la proporción de la tasa. La eficacia de la vacuna se ajustó por la distancia al centro de salud, calculada de acuerdo con procedimientos descritos anteriormente (Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Milman J, y cols. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against Plasmodium falciparum infection and disease in young African children: randomised controlled trial. Lancet 16 de octubre de 2004 16-22; 364(9443): 1411-20) y la comunidad de residencia. En todo el texto se reseña la eficacia de la vacuna ajustada, evaluada usando modelos de regresión de Cox, a no ser que se indique lo contrario. El efecto de las valoraciones de los anticuerpos contra CS sobre el riesgo de infección por malaria se evaluó en el grupo que recibió RTS,S/AS02D comparando la proporción de riesgo (HR) de bebés del tercil de menor respuesta con los del tercil de mayor respuesta, así como estimando el HR de doblar la valoración de anticuerpos contra CS usando modelos de regresión de Cox. Finalmente, se realizó una comparación de la media geométrica de la valoración de niños que habían tenido al menos un episodio de infección por malaria con los que no habían tenido infección por malaria documentada usando una prueba de suma de rangos de Wilcoxon.

15 La muestra del tamaño se basó en la evaluación de la seguridad de la vacuna. Un ensayo con 100 sujetos en cada grupo tenía una potencia del 80% para detectar una diferencia en la proporción de eventos adversos del 26% o más si la frecuencia de un evento del grupo con Engerix-B™ era del 10% o más. Un ensayo de este tamaño también tenía una potencia del 90% para detectar una eficacia contra la infección por malaria de 45% o más asumiendo una proporción de ataque del 75% o más en el grupo de control durante el periodo de supervisión. Los análisis se realizaron usando SAS y STATA.

Papel de la fuente de financiación

40 GSK y CISM ambos recibieron apoyo financiero para realizar el trabajo que se describe en este manuscrito de la Iniciativa de vacuna contra la malaria (MVI) PATH que estuvo relacionada con todos los aspectos del diseño e interpretación del estudio (según las directrices del autor). MVI financió este trabajo a través de una subvención de la Bill & Melinda Gates Foundation. La financiación principal de CISM la proporciona la Agencia española para cooperación internacional (AECI). Resultados

Resultados

45 La Figura 1 muestra el perfil del ensayo. 326 de las 446 mujeres embarazadas cumplieron los criterios de elegibilidad y tuvieron 329 recién nacidos. De estos, se tamizó a 251 y 214 (85%) de los niños tamizados se incluyeron en el ensayo y recibieron la primera dosis de vacuna de DTPw/Hib. Entraron al seguimiento por ADI 93 (86%) de los niños del grupo de RTS,S/AS02D y 92 (85%) del grupo de Engerix-B™. Durante el seguimiento, se retiró el consentimiento de siete niños del grupo de RTS,S/AS02D y de ocho niños del grupo de Engerix-B™. Tres niños de cada grupo recibieron la vacuna equivocada en la dosis 2 de RTS,S/AS02D o Engerix-B™. No se incluyeron en el análisis de ATP. Las características iniciales para ambos grupos se presentan en la Tabla 1.

50 La Figura 2c muestra la proporción de todas las dosis administradas cuando se registraba un síntoma solicitado. La figura presenta cuatro grupos, ya que los datos de DTPw/Hib y OPV se separan por asignación aleatoria. La proporción de niños con dolor fue alta y similar en todos los grupos. La proporción relativa de síntomas fue similar después de cada inyección de RTS,S/AS02D y comparable en magnitud (no se muestran datos). No se documentó ningún síntoma solicitado de grado 3 en el grupo de RTS,S/AS02D, y la incidencia fue muy baja en los otros grupos (no se muestran datos). En la cohorte de ITT seguida hasta el fin del seguimiento el 6 de marzo de 2007, se produjeron 31 SAE en el grupo de RTS,S/AS02D y 30 SAE en el grupo de Engerix-B™. Ninguno de ellos se refirieron como relacionados con la vacunación. Se produjeron cuatro muertes durante este mismo periodo de

seguimiento; todas ellas después del periodo de que hubiera finalizado el periodo de ADI el mes 6 del estudio (2 en el grupo de RTS,S/AS02D y 2 en el grupo de Engerix-B™). Todas las muertes se produjeron en casa. Las autopsias verbales sugieren que una muerte del grupo de RTS,S/AS02D se debió a choque séptico, y las otras tres debido a gastroenteritis y deshidratación grave. Los valores y la proporción de valores anormales de hematología y bioquímica después de la dosis 1 y después de la dosis 3 fueron similares en ambos grupos y no sugieren ninguna señal de seguridad (no se muestran datos).

De los 214 sujetos incluidos en el ensayo (107 RTS,S/AS02D y 107 Engerix-B™) están disponibles los datos de las respuestas de antígenos del EPI para 151 sujetos posteriores a la dosis 3 (76 en el grupo de RTS,S/AS02D y 75 el grupo de control). No hay diferencias en la seroprotección/seropositividad y las valoraciones entre los sujetos de los dos grupos (Aide y cols, manuscrito en preparación). Todos menos tres niños alcanzaron niveles de seroprotección contra todos los antígenos del EPI. Estos tres niños volverán a ser inmunizados con los antígenos contra los que no han respondido.

Los niveles de anticuerpos contra CS y contra HBsAg medidos contra CS y HBsAg se muestran en la Tabla 2. En la selección 24/76 (32%) y 26/77 (34%) de los bebés del grupo de RTS,S/AS02D y de Engerix-B™, respectivamente, presentaban valoraciones bajas de anticuerpos contra CS detectables. Un mes después de la dosis 3, el 99% (70/71) de los bebés que recibieron RTS,S/AS02D tenían anticuerpos contra CS detectables, mientras que la cifra correspondiente entre los bebés que recibieron Engerix-B™ es del 4% (3/68). Tres meses y medio después de la dosis 3 (mes 6 del estudio), la proporción de bebés positivos contra CS en el grupo de RTS,S/AS02D seguía siendo alto (98%) pero la GMT había disminuido. La GMT contra CS en el grupo de Engerix-B™ siguió siendo bajo, aunque la prevalencia de anticuerpos detectables aumentó al 20% (12/61). La respuesta contra la hepatitis B fue buena en ambos grupos (Tabla 2).

La Figura 4 muestra la proporción de niños con al menos un episodio de infección por malaria durante el seguimiento de la ADI que se inició 14 días después de la dosis 3 de RTS,S/AS02D o Engerix-B™ hasta el mes 6 del estudio. Se documentó un total de 68 nuevas infecciones durante este periodo de seguimiento, 22 en el grupo de RTS,S/AS02D y 46 en el grupo de Engerix-B™. La estimación de la eficacia de la vacuna (VE) en bruto fue de 62,2% (IC del 95%, 37,1%; 77,3%, $p=0,0002$) durante el periodo de seguimiento de 3 meses. Ajustada para la distancia hasta el centro de salud y la comunidad de residencia, la VE fue del 65,9% (IC del 95% 42,6%; 79,8%, $p<0,0001$) (Tabla 3). La prevalencia de infección puntual el mes 6 del estudio fue similar entre los dos grupos (5% del grupo de RTS,S/AS02D comparado con 8% del grupo de control, $p=0,536$), ni tampoco se encontraron diferencias entre las densidades medias de parásitos (2082 parásitos por microlitro (DT 5604) del grupo de RTS,S/AS02D comparado con 2579 (DT 6088) del grupo de control, $p=0,85$).

Los criterios de valoración de la exploración contenidos en el RAP incluían estimaciones de la eficacia para la malaria clínica usando diferentes cohortes y definiciones de casos. La eficacia basada en una cohorte de ITT seguida desde el mes 0 al mes 6, usando la definición de malaria de caso primario (primero o único episodio de fiebre con más de 500 parásitos por microlitro) detectada tanto en la ADI como en la PCD, fue del 35,5% (IC del 95% -7,5%; 61,3%, $p=0,093$). Las estimaciones ulteriores de la eficacia para la malaria clínica en una cohorte de ATP que se inició 14 días después de la dosis 3 de RTS,S/AS02D o Engerix-B™ hasta la visita del estudio a los 6 meses, el mismo periodo de seguimiento que se usó en la estimación primaria de VE para la infección, se muestran en la Tabla 3. Tabla 4 refleja los detalles del seguimiento ulterior durante los 12 meses posteriores a la dosis 3, es decir de 3-14 meses.

La relación entre las valoraciones de anticuerpos contra CS anticuerpo y el riesgo de malaria se examinó de varias formas. Primeramente, los presentes inventores compararon las valoraciones de anticuerpos contra CS después de la dosis 3 de RTS,S/AS02D o Engerix-B™ en el grupo de bebés en los que no se documentó infección por malaria durante el seguimiento comparados con los que tuvieron al menos un episodio. De media las valoraciones de anticuerpos contra CS fueron mayores en el grupo anterior (208 comparado con 132, $p=0,026$). Segundo, la proporción de riesgo fue 71% menor entre los bebés del tercil superior de la distribución de anticuerpos que entre los bebés del tercil inferior (IC del 95% 8,4%; 90,7%, $p=0,035$). Finalmente, los presentes inventores examinaron el riesgo de infección por malaria en relación al aumento de las valoraciones de anticuerpos. Valoraciones de anticuerpos del doble se asociaron a una reducción del riesgo de una nueva infección del 6,4% (IC del 95% 10,8; 1,8) $p=0,007$. Un aumento de diez veces en las valoraciones de anticuerpos contra CS se asocia a una reducción del 19,8% del riesgo de nuevas infecciones (IC del 95% 31,6; 5,9).

Basándose en un análisis de los resultados, la eficacia de la vacuna para nuevas infecciones fue del 65% durante un periodo de seguimiento de 3 meses después de completar las inmunizaciones. Esta estimación de la eficacia es superior a la reducción del 45% reseñada en un ensayo anterior (ensayo 026) entre niños mayores con edades comprendidas entre 1 a 4 años seguido en un sistema de ADI comparable en el mismo área de estudio (Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Milman J, y cols. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against Plasmodium falciparum infection and disease in young African children: randomised controlled trial. Lancet 16 de octubre de 2004 16-22; 364(9443): 1411-20). Los periodos de seguimiento en este ensayo y en el 026 no eran idénticos, ligeramente más cortos en los bebés que en los niños mayores. Segundo, los intervalos de confianza de las dos estimaciones se superponen.

Tabla 1 Características línea de base

| | Engerix-B™ (n=92) | | RTS,S/AS02D (n=93) | |
|---|----------------------|-------|-----------------------|-------|
| Edad en la primera dosis [semanas] | 8,3 | (1,0) | 8,3 | (1,4) |
| Sexo | | | | |
| Mujer | 53 | (58%) | 43 | (46%) |
| Varón | 39 | (42%) | 50 | (54%) |
| Área | | | | |
| Ilha Josina | 64 | (70%) | 63 | (68%) |
| Taninga | 28 | (30%) | 30 | (32%) |
| Distancia [Kilómetros] | | | | |
| 0-5 | 79 | (86%) | 77 | (83%) |
| 5-10 | 9 | (10%) | 9 | (10%) |
| 10-17 | 4 | (4%) | 7 | (7%) |

Los datos son la media (DT) o el número de niños (%)

Tabla 2. Media geométrica de las valoraciones (GMT) contra CS y contra HBsAg

| Media geométrica de la valoración/tiempo | Engerix-B™ | | | RTS,S/AS02D | | |
|--|------------|-------|---------------|-------------|---------|------------------|
| | n | valor | (IC del 95%) | n | valor | (IC del 95%) |
| Contra circumporozoito | | | | | | |
| Base | 77 | 0,4 | (0,3; 0,4) | 76 | 0,4 | (0,3; 0,5) |
| 30 días después de la tercera dosis de RTS,S/AS02D o Engerix-B™ | 68 | 0,3 | (0,2; 0,3) | 71 | 199,9 | (150,9; 264,7) |
| 106 días después de la tercera dosis de RTS,S/AS02D o Engerix-B™ | 61 | 0,4 | (0,3; 0,5) | 53 | 58,8 | (41,8; 82,8) |
| Contra HBsAg | | | | | | |
| Base | 70 | 16,6 | (11; 25) | 72 | 14 | (9,6; 20,5) |
| 30 días después de la tercera dosis de RTS,S/AS02D o Engerix-B™ | 64 | 392,4 | (297; 518,5) | 68 | 10081,6 | (7394,9;13744,4) |

Tabla 3: Eficacia de la vacuna a partir de 14 días después de la tercera dosis de Engerix-B™ o RTS,S/AS02D hasta la visita en el mes 6

| Resultado | Engerix-B™ | | | RTS,S/AS02D | | | Eficacia vacuna; (IC del 95%) | p |
|--|------------|------|------|-------------|------|------|----------------------------------|---------|
| | Eventos | PYAR | Tasa | Eventos | PYAR | Tasa | | |
| Infección por malaria | | | | | | | | |
| Primer o único episodio de parasitemia > 0 | 46 | 17,2 | 2,7 | 22 | 21,8 | 1,0 | 65,9% (42,6%; 79,8%) | < 0,001 |
| Malaria clínica | | | | | | | | |
| Primer o único episodio de fiebre y parasitemia > 500 por microlitro | 22 | 19,6 | 1,1 | 9 | 22,6 | 0,4 | 65,8% (25,3%; 84,4%) | 0,007 |
| Primer o único episodio de fiebre o historia de fiebre y parasitemia > 0 | 35 | 18,2 | 1,9 | 17 | 22,4 | 0,8 | 63,1% (33,6%; 79,6%) | <0,001 |

PYAR= Años persona en riesgo. Estimaciones de eficacia de la vacuna ajustadas en base a la distancia del centro de salud y la comunidad.

Tabla 4 038 Eficacia del ensayo 038 ATP [durante un año después de la dosis 3 es decir 3 a 14 meses]

| | RTS, S/AS02D | | Engerix-B | | Estimación puntual de VE para covariables | | Estimación puntual de VE ajustada para covariables | | Estimación puntual de VE no ajustada para covariables | | | | | | | |
|---------------------------|--------------|----------------|--------------|-------------|---|--------------|--|------------|---|--------|------------|---------|--------|--------|--------|--------|
| | Sujetos (N) | N.º de eventos | de PYAR Tasa | Sujetos (N) | N.º de eventos | de PYAR Tasa | (%) | IC del 95% | Valor P | (%) | IC del 95% | Valor P | | | | |
| Enfermedad 1 ^a | 93 | 36 | 61,83 | 0,582 | 92 | 45 | 51,27 | 0,878 | 33,122 | -4,056 | 57,017 | 0,074 | 34,313 | -1,838 | 57,631 | 0,060 |
| Enfermedad 2 ^b | 93 | 45 | 57,26 | 0,786 | 92 | 57 | 41,34 | 1,379 | 41,978 | 13,754 | 60,965 | 0,007 | 41,893 | 14,044 | 60,719 | 0,007 |
| Enfermedad 1 ^c | 93 | 58 | 72,69 | 0,80 | 92 | 74 | 68,83 | 1,08 | 26,2 | -16,6 | 53,3 | 0,1918 | 27,2 | -14,0 | 53,6 | 0,1645 |

PYAR: Episodios/años persona en riesgo; VE: Eficacia de la vacuna (1-HR); CI: intervalo de confianza; valor p del modelo Cox PH; Regresión de Poisson para episodios múltiples
^a primer o único episodio; presencia de parasitemia asexual de *P. falciparum* > 500 por µl y presencia de fiebre ≥ 37,5°C
^b primer o único episodio; cualquier nivel de parasitemia asexual de *P. falciparum* y presencia de fiebre ≥ 37,5°C o historia de fiebre en 24 horas
^c episodios múltiples; presencia de parasitemia asexual de *P. falciparum* > 500 por µl y presencia de fiebre ≥ 37,5°C
 Estimaciones ajustadas para el área y distancia del centro de salud
 Se incluye ADI y PCDD

Referencias

1. Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Noor AM, Snow RW. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *The Lancet Infectious Diseases* 2004; 4(6): 327-336.
- 5 2. Breman JG, Alilio MS, Mills A. The intolerable burden of malaria: what's new, what's needed. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71 (2_supl):0-i-.
3. Klausner R, Alonso P. An attack on all fronts. *Nature* 2004; 430(7002): 930-1.
4. Graves P, Gelband H. Vaccines for preventing malaria (pre-erythrocytic). *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2006, N.º 4. Art. n.º: CD006198
- 10 5. Ballou WR, Arevalo-Herrera M, Carucci D, Richie TL, Corradin G, Diggs C, y cols. Update on the clinical development of candidate malaria vaccines. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71 (2 supl):239-247.
6. Stoute J, Slaoui M, Heppner D, Momin P, Kester K, Desmons P, y cols. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. N Engl J Med* 1997; 336(2): 86-91.
- 15 7. Bojang KA, Milligan PJM, Pinder M, Vigneron L, Allouche A, Kester KE, y cols. Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial. *The Lancet* 2001; 358(9297): 1927-1934.
8. Bojang KA, Olotude 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. Safety and immunogenicity of RTS,S/AS02A candidate malaria vaccine in Gambian children. Vaccine published.
- 20 9. Macete E, Aponte JJ, Guinovart C, Sacarlal J, Mandomando I, Espasa M, y cols. Safety, reactogenicity and immunogenicity of the RTS,S/AS02A candidate malaria vaccine in children aged 1 to 4 years in Mozambique. Vaccine published.
10. Alonso P, Saúte F, Aponte J, Gómez-Olivé F, Nhacolo A, Thomson R, y cols. Manhica DSS, Mozambique. In: INDEPTH, ed. *Population and Health in Developing Countries*. Ottawa: International Development Research Centre, 2001: 189-195.
11. Dame JB, Williams JL, McCutchan TF, Weber JL, Wirtz RA, Hockmeyer WT, Maloy WL, Haynes JD, Schneider I, Roberts D, y cols. Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*. 1984; 225: 593-9.
- 30 12. Young JF, Hockmeyer WT, Gross M, Ballou WR, Wirtz RA, Trospen JH, Beaudoin RL, Hollingdale MR, Miller LH, Diggs CL, y cols. Expression of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite proteins in *Escherichia coli* for potential use in a human malaria vaccine. *Science* 1985; 228: 958-62.
13. Doherty J, Pinder M, Tornieporth N, Carton C, Vigneron L, Milligan P, y cols. 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* 1999; 61(6): 865-868.
- 35 14. Loscertales MP, Roca A, Ventura P, Abascassamo F, Dos Santos F, Sitaube M, y cols. Epidemiology and clinical presentation of respiratory syncytial virus infection in a rural area of southern Mozambique. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21: 148-155.
15. Alonso P, Smith T, Schellenberg J, Masanja H, Mwankusye S, Urassa H, y cols. Randomised trial of efficacy of SPf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania. *The Lancet* 1994; 344: 1175-81.
16. Saúte F, Aponte J, Almeda J, Ascaso C, Abellana R, Vaz N, y cols. Malaria in southern Mozambique: malariometric indicators and malaria case definition in Manhica district. en prensa.
- 45 17. World Health Organization. *Management of severe malaria, a practical handbook*. Segunda edición, 2000. <http://mosquito.who.int/docs/hbsm.pdf>
18. Therneau TM, Grambsch PM. *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. Nueva York: Springer, 2000.
19. Hess KR. Graphical methods for assessing violations of the proportional hazards assumption in Cox regression. *Stat Med* 1995; 14(15): 1707-23.
20. Cytel Software Corporation. *StatXact PROCs for SAS Users (version 6)*. Cambridge, MA, EE. UU.
- 50 21. SAS Institute Inc. *SAS software (version 8)*. Cary, NC, EE. UU.
22. Stata Corporation. *Stata Statistical Software (Release 8.0)*. College Station, TX, EE. UU. 2003.
23. Sun P, Schwenk R, White K, Stoute JA, Cohen J, Ballou WR, Voss G, Kester KE, Heppner DG, Krzych U. 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*. 2003 Dec 15; 171(12): 6961-7.
- 55 24. 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. Long Term Efficacy and Immune Responses Following Immunization with the RTS,S Malaria Vaccine. *J Infect Dis* 178:1139-44, 1998.

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de un antígeno derivado de la proteína circumesporozoíto (CS) de *Plasmodium falciparum* que se expresa en la etapa preeritrocítica de la infección por malaria combinado con un adyuvante farmacéuticamente aceptable que comprende una combinación de 3D-MPL y QS21, en la fabricación de un medicamento para vacunar bebés contra la malaria, en el que la población diana son bebés de menos de 1 año de edad y el antígeno CS está en forma de una proteína híbrida que comprende una secuencia que contiene al menos 160 aminoácidos de la porción C-terminal de la proteína CS y cuatro o más repeticiones en tándem de la región inmunodominante de la proteína CS, condensado al antígeno superficial de la hepatitis B (HBsAg).
- 10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la formulación de antígeno y adyuvante comprende además un antígeno seleccionado a partir del grupo constituido por CS, LSA-1, LSA-3, AMA-1, MSP-1, TRAP, Exp-1 o un fragmento inmunógeno del mismo.
- 15 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2 en el que la proteína híbrida comprende una secuencia de proteína CS de *P. falciparum* como correspondiente a los aminoácidos 207-395 de la proteína CS del clon 3D7 de la cepa NF54 de *P. falciparum* fusionada en marco mediante un enlazador lineal al extremo N de HBsAg.
- 15 4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la proteína híbrida es RTS.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el RTS está en forma de partículas RTS,S mixtas.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5 en el que la cantidad de RTS,S es 25 µg por dosis.
7. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que el adyuvante comprende además una emulsión de aceite en agua.
- 20 8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que el adyuvante comprende además liposomas.
9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que el adyuvante se formula en forma de dosis pediátrica.
- 25 10. Un antígeno derivado de la proteína circumesporozoíto (CS) de *Plasmodium falciparum* que se expresa en la etapa preeritrocítica de la infección por malaria combinado con un adyuvante farmacéuticamente aceptable que comprende una combinación de 3D-MPL y QS21 para su uso para vacunar bebés contra la malaria, en el que la población diana son bebés de menos de 1 año de edad y el antígeno CS está en forma de una proteína híbrida que comprende una secuencia que contiene al menos 160 aminoácidos de la porción C-terminal de la proteína CS y cuatro o más repeticiones en tándem de la región inmunodominante de la proteína CS, condensado al antígeno superficial de la hepatitis B (HBsAg).
- 30 11. El antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 en el que la proteína híbrida es RTS.
12. El antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 en el que el RTS está en forma de partículas RTS,S mixtas.
- 35 13. El antígeno para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 en el que el adyuvante comprende además liposomas.

Figura 1. Diseño del estudio de criterios de valoración de la eficacia primaria

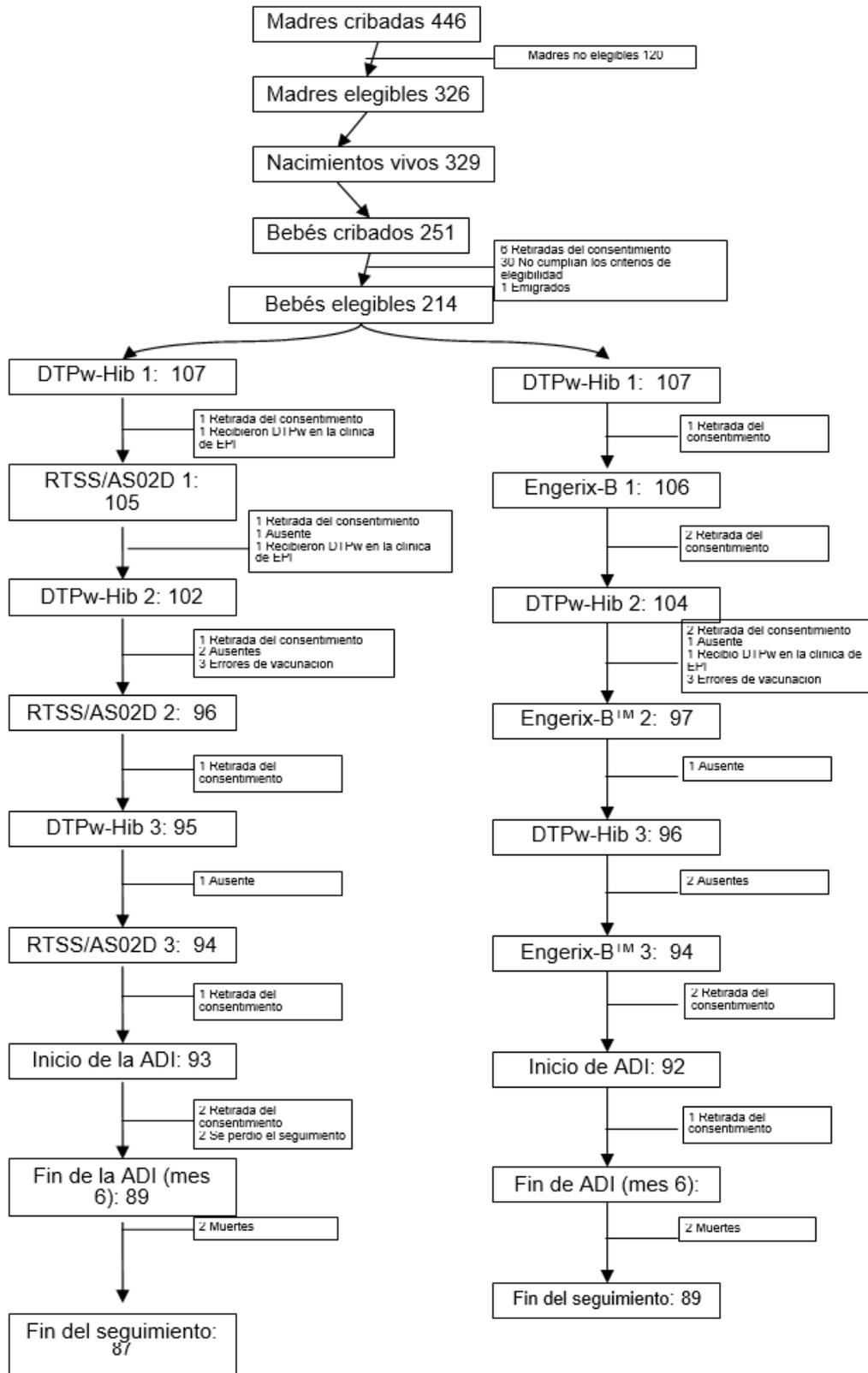


Figura 1a: Diseño del ensayo

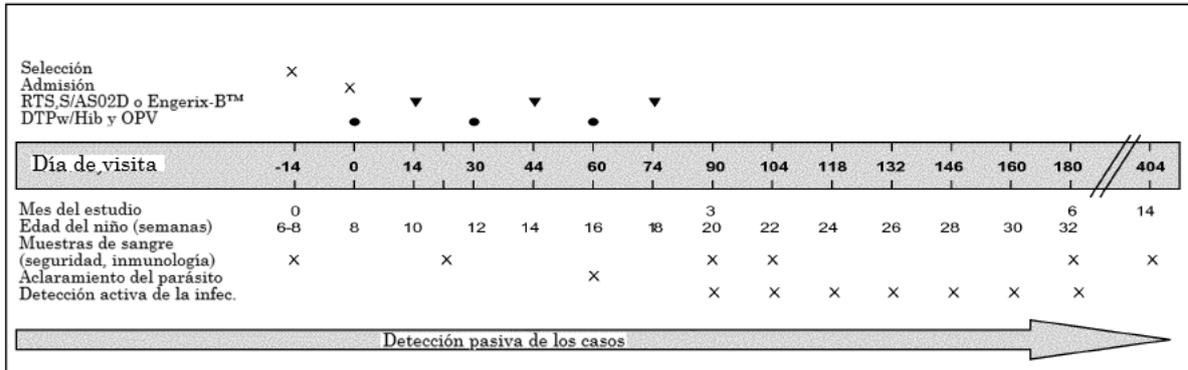


Figura 2a

Datos de la capacidad reactógena

Las gráficas siguientes representan las reacciones sistémicas y locales solicitadas tras la vacunación.

R quiere decir RTS,S

E quiere decir Engerix-BTM.

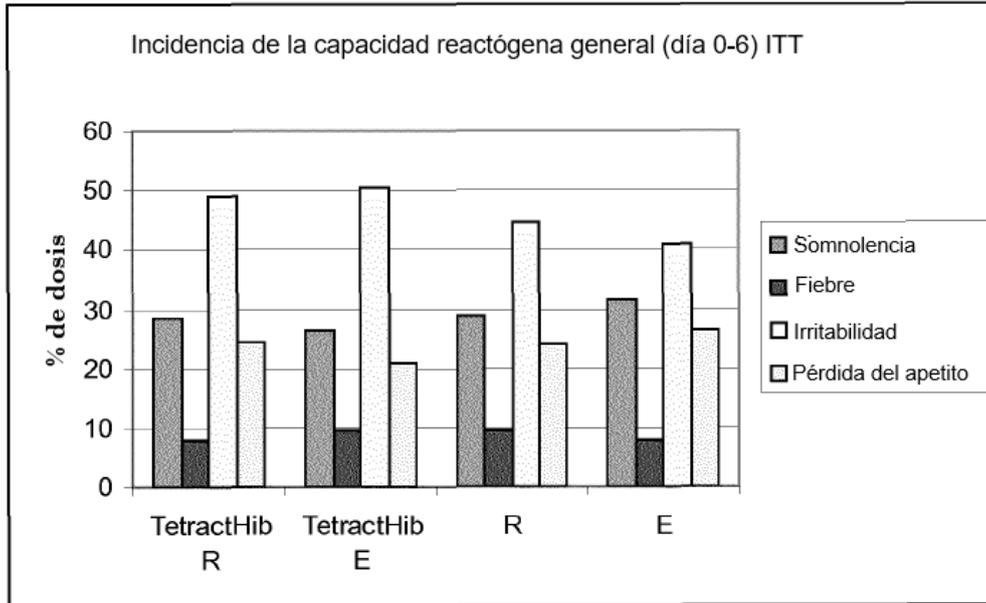


Figura 2b

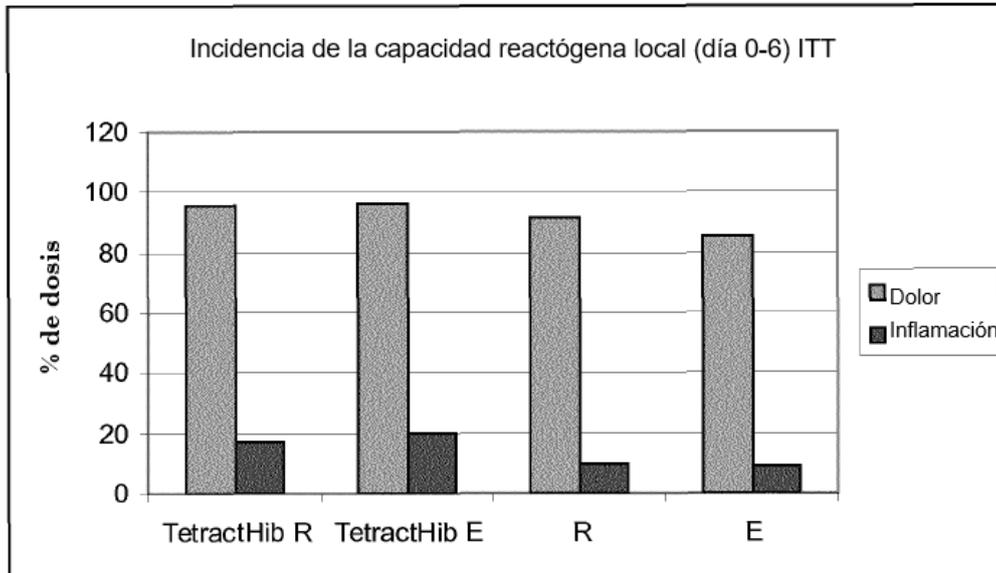


Figura 2c: Proporción de dosis con síntomas generales reseñados durante el periodo de 7 días posterior a la vacunación

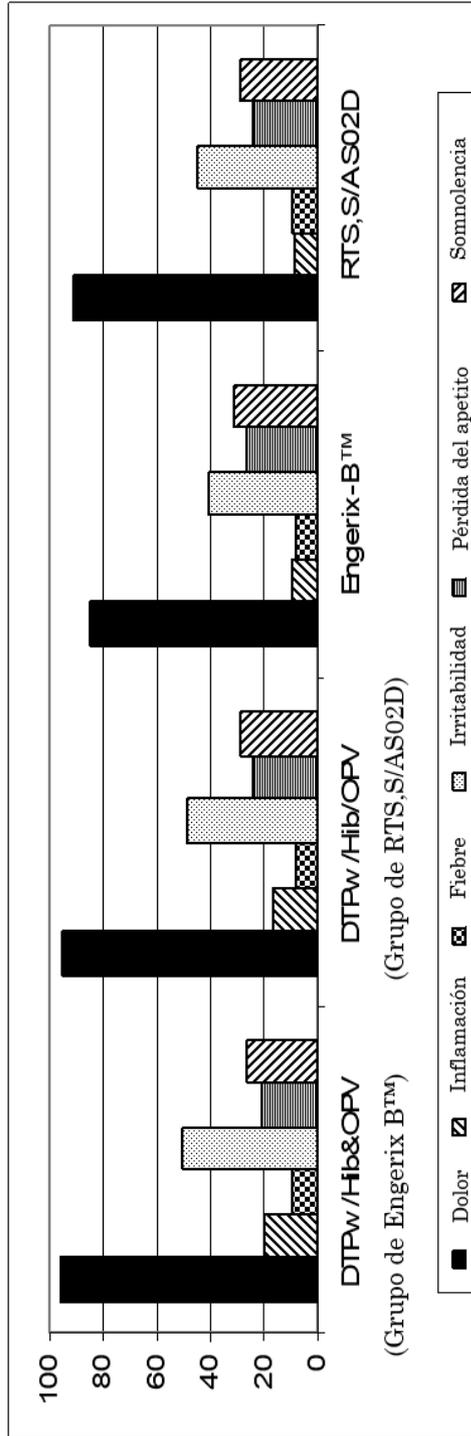


Figura 3
Eficacia

| | RTS,S/AS02D | | | | Engerix-B | | | | Estimación puntual de VE ajustada para covariables | | | | Estimación puntual de VE no ajustada para covariables | | | |
|---------------------------|-------------|----------------|-------|-------|-------------|----------------|-------|-------|--|---------|----------------|---------|---|---------|----------------|---------|
| | Sujetos (N) | N.º de eventos | PYAR | Tasa | Sujetos (N) | N.º de eventos | PYAR | Tasa | IC del 95% (%) | Valor P | IC del 95% (%) | Valor P | IC del 95% (%) | Valor P | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | IC del 95% (%) | Valor P |
| Infección ^a | 93 | 22 | 21,82 | 1,008 | 92 | 46 | 17,22 | 2,671 | 65,943 | 42,600 | 79,794 | <0,001 | 62,238 | 37,120 | 77,322 | <0,001 |
| Enfermedad 1 ^b | 93 | 9 | 22,61 | 0,398 | 92 | 22 | 19,56 | 1,125 | 65,824 | 25,293 | 84,366 | 0,007 | 64,432 | 22,646 | 83,646 | 0,009 |
| Enfermedad 2 ^c | 93 | 17 | 22,36 | 0,760 | 92 | 35 | 18,19 | 1,924 | 63,143 | 33,568 | 79,552 | <0,001 | 60,976 | 30,213 | 78,178 | 0,002 |
| Enfermedad 3 ^d | 107 | 25 | 48,51 | 0,515 | 107 | 36 | 46,02 | 0,782 | 38,798 | -2,215 | 63,355 | 0,061 | 35,475 | -7,535 | 61,282 | 0,093 |

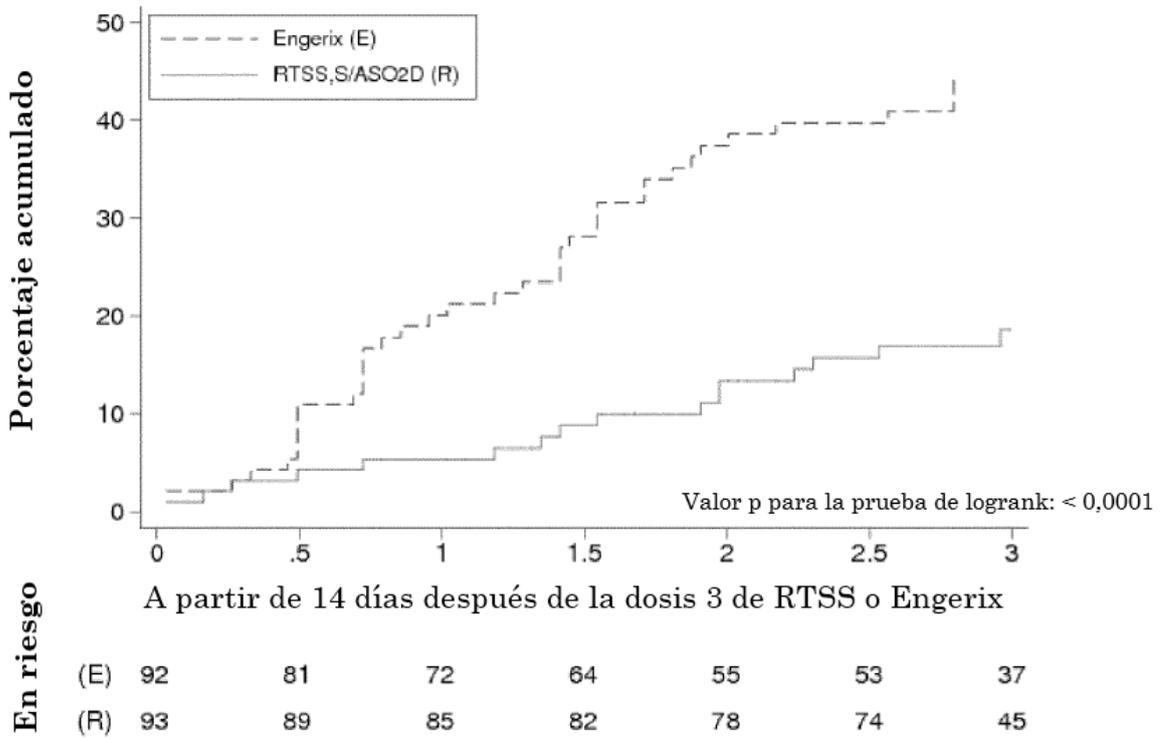


Figura 4: Curvas de Kaplan-Meier para la proporción acumulada con al menos un episodio de infección por malaria en el ensayo 038

Figura 5a. Curva de Kaplan-Meier para la proporción de niños con al menos un episodio de malaria clínica en el estudio 026 (niños de 1-4 en Mozambique)

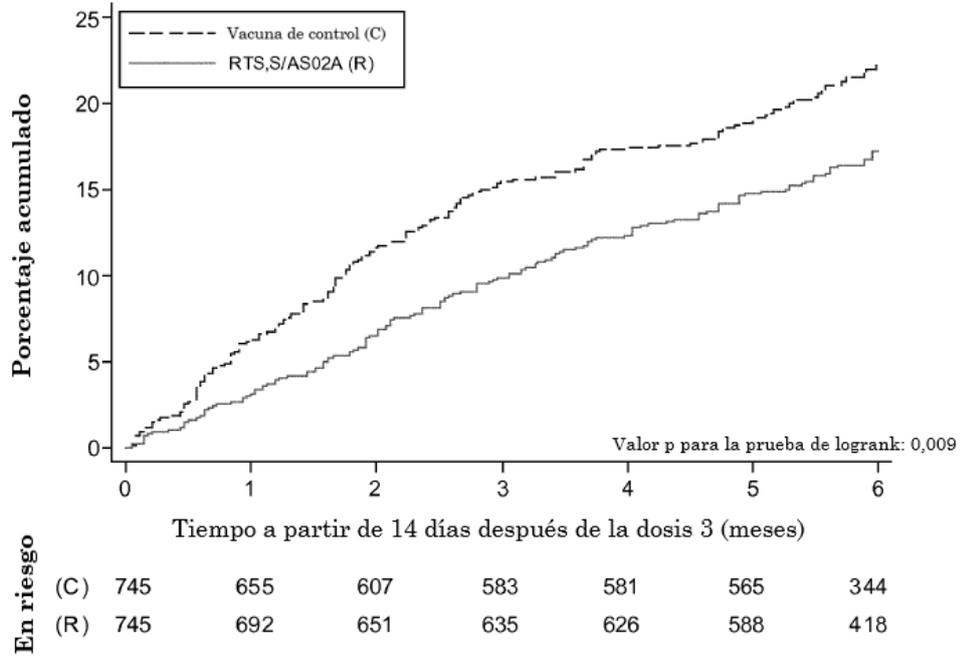


Figura 5b. Curva de Kaplan-Meier para la proporción de niños con al menos un episodio de infección por malaria en el estudio 026 (niños de 1-4 en Mozambique)

