



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 923**

51 Int. Cl.:

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C07K 14/445 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08701640 .8**

96 Fecha de presentación : **23.01.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2121736**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.11.2009**

54

Título: **Nuevas composiciones vacunales antipalúdicas y sus aplicaciones.**

30

Prioridad: **23.01.2007 FR 07 52837**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.08.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.08.2011

73

Titular/es: **Centre National de la Recherche
Scientifique (CNRS)
3, rue Michel Ange
75016 Paris, FR
Universite des Sciences et Technologies de Lille**

72

Inventor/es: **Tomavo, Stanislas;
Ball, Steven Graham;
D'Hulst, Christophe y
Dauvillee, David**

74

Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 363 923 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

Nuevas composiciones vacunales antipalúdicas y sus aplicaciones.

5 La presente invención se refiere al paludismo y, más específicamente, a un polipéptido destinado a la vacunación antipalúdica, a una composición farmacéutica que lo contiene y a la utilización de dicho polipéptido para la preparación de una composición destinada al tratamiento profiláctico del paludismo.

10 El paludismo, que resulta de una infección mediante un parásito del género *Plasmodium*, sigue siendo en la actualidad la endemia principal en el mundo con cerca de 300 y 500 millones de casos y más de 2,5 millones de muertes por año, de los cuales mayoritariamente niños de menos de cinco años (World Health Organization Tropical Disease Research, TDR Twelfth Program Report, p. 57-76, 1997). En la actualidad, más del 40% de la población mundial vive en las regiones en las que castiga el paludismo.

15 Se han desarrollado diferentes tratamientos profilácticos y terapéuticos contra este parásito, actuando las moléculas más eficaces durante la fase de infección de los glóbulos rojos. Se puede citar así la cloroquina (NIVAQUINE), la halofantrina (HALFAN), la mefloquina (LARIAM) y la quinina; siendo la quinina en la actualidad el medicamento de referencia. Sin embargo, numerosas de estas moléculas presentan importantes efectos secundarios y se observa la aparición de resistencias a ciertos medicamentos antipalúdicos desarrolladas por el parásito más peligroso
20 (*Plasmodium falciparum*) en ciertas zonas geográficas.

Las vías de investigación de una vacuna antipalúdica son numerosas en la actualidad y se han podido identificar cerca de 40 antígenos que se pueden utilizar para la elaboración de una vacuna, dependiendo dichos antígenos del estado de desarrollo del parásito. Se pueden distinguir así para el estado intramosquito (estados sexuados); el
25 antígeno Pfg27, Pfs16, Pfs25, Pfs28, Pfs45/48 o Pfs230; para el estado intravascular (esporozoito): el antígeno CSP-1, STARP, SALSA o SSP-2; para el estado intrahepático: el antígeno LSA-1, EXP-1, LSA-3, STARP, SALSA o SSP-2; y para el estado intra-eritrocito (merozoito): el antígeno RAP-1, RAP-2, SERA-1, MSP-1, MSP-2, MSP-3, MSP-4, MSP-5, AMA-1, EMP-1, Pf35, Pf55 o EBA-175.

30 A título de ejemplo de antígeno, se puede citar el antígeno membranario apical 1 (AMA1; número de registro CAD42016 a CAD41967, CAD35671 a CAD35504, CAD34791 a CAD34741 y CAD31724 a CAD31720) que corresponde a una proteína transmembranaria identificada en el origen en *Plasmodium knowlesi* (DEANS *et al.*, Clin. Exp. Immunol., vol. 49, p. 297-309, 1982; DEANS *et al.*, Mol. Biochem. Parasitol., vol. 11, p. 189-204; 1984) y, ulteriormente, en otras especies que pertenecen al género *Plasmodium* (WATERS *et al.*, J. Biol. Chem., vol. 265, p. 17974-17979, 1990). Esta proteína está presente en las organelas apicales del merozoito del parásito de la malaria en el estado esquizonte tardío (HEALER *et al.*, Infect. Immun., vol. 70, p. 5751-5758, 2002; BANNISTER *et al.*, J. Cell. Sci., vol. 116, p. 3825-3834, 2003) o en la superficie del merozoito en el estado de ruptura del esquizonte y de la invasión de los eritrocitos (NARUM y THOMAS, Mol. Biochem. Parasitol., vol. 67, p. 59-68, 1994). Se ha podido demostrar que la presencia de anticuerpos dirigidos contra el antígeno AMA1 permite impedir la invasión de eritrocitos (THOMAS *et al.*, Mol. Biochem. Parasitol., vol. 13, p. 187-199, 1984; KOCKEN *et al.*, J. Biol. Chem., vol. 273, p. 15119-15124, 1998; HODDER *et al.*, Infect. Immun., vol. 69(5), p. 3286-94, 2001), que sugiere un papel crítico asociado a este antígeno de superficie. Además, se ha demostrado que la expresión de la proteína AMA1 es vital para la supervivencia del parásito (TRIGLIA *et al.*, Mol. Microbiol., vol. 38, p. 706-718, 2000). Por último, se ha descrito la producción de AMA1 en diferentes sistemas, pero resulta problemática debido a las cantidades insuficientes (baculovirus) o problemas de repliegue (*E. coli*) relacionado con el gran número de puentes disulfúricos.
45

Se puede citar asimismo el antígeno MSP1 (Merozoite Surface Protein 1; número de registro BAA2624 a BAA2604, AAQ20930 a AAQ20923, y AAC69750 a AAC69718) que se sintetiza en el estado esquizonte y que está implicado en particular en la invasión eritrocitaria por el parásito. Durante esta última, la MSP1 sufre varios cortes proteolíticos durante el proceso de maduración del merozoito. Entre estos productos de escisión, un fragmento que corresponde al extremo C-terminal de MSP1 y que presenta una masa molecular de aproximadamente 42 kDa (MSP1-42; HOLDER *et al.*, Parasitology, vol. 94, p.199-208, 1987; LYON *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 83, p. 2989-2993, 1986). El MSP1-42 sigue enganchado a la membrana del merozoito en la fase anterior a la invasión. En el mismo momento de la invasión, el MSP1-42 se escinde a su vez en dos fragmentos: un fragmento N-terminal de aproximadamente 33 kDa y un fragmento C-terminal de aproximadamente 19 kDa (MSP1-19; BLACKMAN *et al.*, Mol. Biochem. Parasitol., vol. 50, p. 307-316, 1992). Este último corte es esencial para el éxito de la invasión, aunque el mecanismo del proceso no se haya elucidado aún. Debido a las dificultades para producir la proteína MSP1 debido a su tamaño importante (aproximadamente 200 kDa), los investigadores han estudiado esencialmente la porción C-terminal que presenta seguramente la función (desconocida hasta ahora) más importante. Por último, la producción de proteínas recombinantes que comprenden la parte C-terminal de MSP1 ha sido descrita en particular con una p19 y una p40 fusionadas cada una a una glutatión-S-transferasa producida en *E. coli* (BURGHAUS *et al.*, Infection and Immunity, vol. 64, p. 3614-3619, 1996; KUMAR *et al.*, Molecular Medicine, vol. 1 (3), p. 325-332, 1995), o una p19 fusionada con un polipéptido derivado de una anatoxina tetánica y que contiene unos epítomos de células T auxiliares producido en *S. cerevisiae* (KUMAR *et al.*, 1995, citado anteriormente). Sin embargo, estas diferentes proteínas recombinantes han mostrado una eficacia variable en términos de producción de anticuerpos después de la inyección en el mono.
65

Por último, y a pesar de los esfuerzos importantes emprendidos por la comunidad científica internacional, los diferentes candidatos vacunales ensayados han mostrado sólo una eficacia relativa y muy limitada para la protección contra el paludismo. Además, el hecho de que el paludismo se localice esencialmente a nivel de países en vías de desarrollo impone, para una eventual vacuna, responder a 3 criterios esenciales de (1) eficacia inmediata, (2) administración fácil y (3) bajo coste.

Es en este contexto donde los inventores han desarrollado una estrategia original que consiste en la utilización del almidón como vector que contiene unos epítomos de *plasmodium falciparum* con el fin de elaborar una vacuna.

El almidón, polímero de reserva por excelencia del reino vegetal, representa una de las fuentes más importantes de polisacáridos presentes en la tierra y se puede encontrar, en particular, en las plantas (maíz, patata, trigo, arroz, cebada, etc.), las algas, las microalgas, etc. El almidón se presenta en forma de granos insolubles, cuyo tamaño puede estar comprendido entre 0,1 y varias decenas de μm de diámetro, y se compone por dos sub-fracciones polisacáridicas denominadas amilosa y amilopectina, que representan cada una aproximadamente 25 y 75% en peso del grano de almidón respectivamente. Compuestas únicamente por residuos de glucosa unidos por enlaces alfa-1,4 y ramificados en alfa-1,6, estas dos fracciones difieren tanto desde un punto de vista arquitectural como en la naturaleza de las funciones enzimáticas que intervienen en su síntesis. Mientras que la amilopectina (la fracción principal del grano de almidón que le confiere su carácter cristalino) necesita un conjunto complejo de enzimas para su elaboración, la formación de la amilosa sólo necesita que intervenga una almidón-sintetasa particular denominada GBSS (Granule Bound Starch Synthase).

Varias isoformas de GBSS han sido aisladas en el maíz, el guisante, la patata o también el trigo (MACDONALD y PREISS, Plant Physiology, vol. 78, p. 849-852, 1985; SMITH, Planta, vol. 182, p. 599-604, 1990; DRY *et al.*, The Plant Journal, vol. 2(2), p. 193-202, 1992; DENYER *et al.*, Planta, vol. 196, p. 256-265, 1995). En todos los casos, es la GBSSI la que representa la isoforma principal; estando dicha isoforma implicada en la formación de amilosa durante la biogénesis del grano de almidón (TSAI, Biochemical Genetics, vol. 11 (2), p. 83-95, 1974; HOVENKAMP-HERMELINK *et al.*, Theoretical and Applied Genetics, vol. 75, p. 217-221, 1987; DELRUE *et al.*, Journal of Bacteriology, vol. 174(11), p. 3612-3620, 1992; DENYER *et al.*, 1995, antes citado) y conteniendo los mutantes deficientes para esta enzima sólo amilopectina.

La enzima GBSSI utiliza ADP-glucosa con el fin de unir entre sí los residuos mediante unos enlaces alfa-1,4 que dan lugar a largas cadenas poco ramificadas características de la fracción amilósica. Una particularidad notable de esta enzima se basa en la necesidad de estar unida a una matriz polisacáridica para efectuar la reacción enzimática. Así, la enzima se observa sólo cuando esta aprisionada dentro del grano de almidón y representa ella sola cerca de 1% del peso en seco del almidón en unas condiciones de cultivo óptimas para su producción. Esta abundancia y la localización atípica de la enzima generan numerosas ventajas tecnológicas. La GBSSI puede así ser purificada muy fácilmente con la ayuda de protocolos utilizados en rutina tanto a escala de laboratorio como industrial. El almidón purificado que contiene la proteína puede ser conservado asimismo sin degradación notable durante meses a temperatura ambiente. La localización particular de la proteína de interés (dentro mismo del grano de almidón) permite librarse asimismo de la presencia de alérgenos vegetales frecuentemente observados durante la preparación de proteínas recombinantes en la planta.

Un ADNc que corresponde a la proteína Waxy (por abuso de lenguaje, se utiliza el término proteína Waxy para designar la GBSSI en las plantas, diferenciándola así de las demás GBSS) ha sido aislado en el trigo, la cebada, el maíz, el arroz, la patata y el guisante. Esta proteína de aproximadamente 60 kDa posee una secuencia altamente conservada en el reino vegetal (Ainsworth *et al.*, Plant Mol Biol., vol. 22(1), p. 67-82, 1993). Sin embargo, se debe observar una excepción notable en el caso del alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, en la que la enzima presenta una extensión carboxi-terminal de 12 kDa de secuencia no pertinente que procede seguramente de una fusión con otro gen (WATEFELD *et al.*, Eur. J. Biochem., vol. 269(15), p. 3810-20, 2002). Una cepa mutante de *Chlamydomonas* aislada por el equipo de Steven Ball produce una proteína truncada de 4 kDa de esta extensión, pero posee todavía su capacidad para fijarse en el interior del grano de almidón.

Los inventores han fusionado un péptido que contiene unos epítomos de *Plasmodium falciparum* con la proteína GBSSI de la alga *Chlamydomonas*. Han demostrado entonces que la proteína de fusión que comprende el péptido parasitario MSP1 producida en el almidón del alga es muy inmunogénica en los conejos y en los ratones, lo cual conduce a la producción de anticuerpos policlonales que son capaces de reconocer muy específicamente el antígeno MSP1 nativo así como los parásitos. Por último, estos anticuerpos policlonales son capaces asimismo de inhibir completamente *in vitro*, la penetración de *Plasmodium falciparum* en el interior de los hematíes. Estos resultados abren ahora la vía hacia la expresión de otros antígenos de *Plasmodium* en el alga *Chlamydomonas*, en particular de los epítomos teóricamente invariables que pertenecen a los antígenos de estructuras apicales, lo cual debería permitir la realización de los ensayos de protección contra la infección y la enfermedad en unos modelos murinos.

En la solicitud internacional PCT WO 00/71734, los inventores han descrito el principio de proteínas de fusión entre una proteína GBSSI truncada o no y un polipéptido de interés. Pero este documento no hace caso de la utilización

de dichas proteínas de fusión con fines vacunales, ni tampoco la posibilidad de obtener unas proteínas de fusión en las que el polipéptido que corresponde al epítipo presenta un repliegue correcto. En todos los casos, este documento no describe ni sugiere unas proteínas de fusión que comprenden unos epítipos de un parásito del género *Plasmodium* que permite obtener una respuesta inmune determinada después de la inyección.

En consecuencia, un primer objeto de la invención se refiere a un polipéptido cuya secuencia N-terminal comprende la secuencia polipeptídica de la GBSSI (Granule Bound Starch Synthase I), una secuencia polipeptídica que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos 80% con dicha secuencia polipeptídica de la GBSSI o un fragmento de por lo menos 50 aminoácidos de dicha secuencia polipeptídica de la GBSSI;

(i) presentando dicha secuencia polipeptídica la capacidad para fijarse al almidón; y

(ii) comprendiendo la secuencia C-terminal una secuencia polipeptídica que codifica para por lo menos un epítipo de un antígeno de un parásito del género *Plasmodium*.

La secuencia de la GBSSI en diferentes especies de plantas, de algas o de microalgas forma parte de los conocimientos generales del experto en la materia o podrá ser determinada mediante simples experimentos de rutina debido a la conservación de su secuencia.

Por secuencia polipeptídica de la GBSSI, se entiende la secuencia polipeptídica de la GBSSI madura, después de la escisión del péptido señal del precursor de la GBSSI.

La conservación de secuencias de la proteína GBSSI entre las especies aparece claramente con respecto a la figura 1 que muestra una alineación de las secuencias de GBSSI maduras de trigo (*Triticum aestivum*; número de registro: P27736), de *Chlamydomonas reinhardtii* (número de registro: AAL28128), del maíz (*Zea mays*; número de registro: P04713), del guisante (*Pisum sativum*; número de registro: Q43092), del arroz (*Oriza sativa*; número de registro: P19395), de la cebada (*Hordeum vulgare*; número de registro: P09842) y de la patata (*Solanum tuberosum*; número de registro: Q00775).

Ventajosamente, la secuencia polipeptídica de la GBSSI se selecciona de entre el grupo constituido por la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* (SEC ID nº: 1), de trigo (*Triticum aestivum*; SEC ID nº: 2), de maíz (*Zea mays*; SEC ID nº: 3), de guisante (*Pisum sativum*; SEC ID nº: 4), de arroz (*Oriza sativa*; SEC ID nº: 5), de cebada (*Hordeum vulgare*; SEC ID nº: 6), de patata (*Solanum tuberosum*; SEC ID nº: 7), de soja (*Glycine max*; SEC ID nº: 8) y de judía verde (*Phaseolus vulgaris*; SEC ID nº: 9).

Preferentemente, la secuencia polipeptídica de la GBSSI corresponde a la secuencia polipeptídica de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* (SEC ID nº: 1), y de manera más particularmente preferida a la secuencia polipeptídica comprendida entre las posiciones 1 y 527 de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* (SEC ID nº: 1).

Por fragmento de GBSSI, se entiende un polipéptido de por lo menos 50 aminoácidos, a título de ejemplo de por lo menos 100 ó 150 aminoácidos, preferentemente de por lo menos 200 aminoácidos, a título de ejemplo de por lo menos 250 ó 350 aminoácidos, y de manera particularmente preferida un polipéptido de por lo menos 400 aminoácidos.

A título de ejemplo, los inventores han podido mostrar que el fragmento comprendido entre la posición 1 y la posición 438 de la GBSSI madura en *Chlamydomonas reinhardtii* (SEC ID nº: 1). El experto en la materia es capaz de deducir en base a sus únicos conocimientos generales los fragmentos correspondientes de GBSSI en otras especies.

Preferentemente, unos fragmentos de GBSSI capaces de unirse al almidón se seleccionan de entre el grupo constituido por la secuencia polipeptídica comprendida entre las posiciones 1 y 438 de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* (SEC ID nº: 1), 1 y 449 de la GBSSI de trigo (*Triticum aestivum*; SEC ID nº: 2), 1 y 437 de la GBSSI de maíz (*Zea mays*; SEC ID nº: 3), 1 y 432 de la GBSSI de guisante (*Pisum sativum*; SEC ID nº: 4), 1 y 436 de la GBSSI de arroz (*Oriza sativa*; SEC ID nº: 5), 1 y 437 de la GBSSI de cebada (*Hordeum vulgare*; SEC ID nº: 6), 1 y 434 de la GBSSI de patata (*Solanum tuberosum*; SEC ID nº: 7), 1 y 435 de la GBSSI de soja (*Glycine max*; SEC ID nº: 8) y 1 y 431 de la GBSSI de judía verde (*Phaseolus vulgaris*; SEC ID nº: 9).

Por antígeno, se entiende en la presente invención un polipéptido capaz de desencadenar una reacción inmunitaria de mediación humoral o de mediación celular.

El experto en la materia podrá identificar simplemente y en base a sus conocimientos generales un antígeno de un parásito del género *Plasmodium*, en particular de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* o *Plasmodium malariae*, preferentemente un antígeno de *Plasmodium falciparum* o de *Plasmodium vivax*, y de manera particularmente preferida un antígeno de *Plasmodium falciparum*.

A título de ejemplo de dichos antígenos, se pueden citar los antígenos siguientes: Pfg27/25 (SEC ID nº: 10), Pfs16

(SEC ID nº: 11), Pfs25 (SEC ID nº: 12), Pfs28 (SEC ID nº: 13), Pfs48/45 (SEC ID nº: 14), Pfs230 (SEC ID nº: 15), CSP-1 (SEC ID nº: 16), STARP (SEC ID nº: 17), SALSA (SEC ID nº: 18), SSP-2 (SEC ID nº: 19), LSA-1 (SEC ID nº: 20), EXP-1 (SEC ID nº: 21), LSA-3 (SEC ID nº: 22), RAP-1 (SEC ID nº: 23), RAP-2 (SEC ID nº: 24), SERA-1 (SEC ID nº: 25), MSP-1 (SEC ID nº: 26), MSP-2 (SEC ID nº: 27), MSP-3 (SEC ID nº: 28), MSP-4 (SEC ID nº: 29), MSP-5 (SEC ID nº: 30), AMA-1 (SEC ID nº: 31), EMP-1 (SEC ID nº: 32) y EBA-175 (SEC ID nº: 33).

Por epítopo, se entiende una estructura presente en la superficie de la molécula de antígeno y capaz de fijarse a una sola molécula de anticuerpos.

10 Ventajosamente, se entiende por epítopo una secuencia polipeptídica derivada de la secuencia polipeptídica de un antígeno de un parásito del género *Plasmodium*.

15 Aún más ventajosamente, se entiende por epítopo una secuencia polipeptídica de por lo menos 6 aminoácidos, preferentemente de por lo menos 8 aminoácidos, por ejemplo de por lo menos 10 aminoácidos, y de manera particularmente preferida de por lo menos 12 aminoácidos.

20 El experto en la materia, en base a sus conocimientos generales y de simples experiencias de rutina, será capaz de identificar en la secuencia de un antígeno de un parásito del género *Plasmodium*, la secuencia polipeptídica que codifica para un epítopo reconocido específicamente por un anticuerpo. A título de ejemplo, el experto en la materia podrá utilizar en particular el procedimiento descrito en la solicitud internacional PCT WO 02/30964.

25 Por secuencia derivada, se entiende una secuencia polipeptídica que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos 70%, preferentemente de por lo menos 80% y de manera particularmente preferida de por lo menos 90% con la secuencia polipeptídica de un antígeno de un parásito del género *Plasmodium*.

La secuencia polipeptídica del epítopo podrá así comprender unas sustituciones (1, 2 ó 3) con respecto a la secuencia polipeptídica de un antígeno de un parásito del género *Plasmodium*, de manera que se mejora el anclaje y así la presentación del polipéptido correspondiente a dicho epítopo por las moléculas de CHM de clase II.

30 Según un modo de realización preferido, la secuencia polipeptídica de dicho epítopo presenta una identidad de 100% con la secuencia polipeptídica de un antígeno de un parásito del género *Plasmodium*.

Según un modo de realización preferido, dicho antígeno corresponde al antígeno MSP1 (SEC ID nº: 26).

35 Preferentemente, la secuencia polipeptídica que codifica para por lo menos un epítopo de un antígeno de un parásito del género *Plasmodium* es la secuencia SEC ID nº: 34.

Ventajosamente, el polipéptido según la invención presenta la secuencia SEC ID nº: 35.

40 Según un segundo modo de realización preferido, dicho antígeno corresponde al antígeno AMA-1 (SEC ID nº: 31).

Preferentemente, la secuencia polipeptídica que codifica para por lo menos un epítopo de un antígeno de un parásito del género *Plasmodium* es la secuencia SEC ID nº: 36.

45 Ventajosamente, el polipéptido según la invención presenta la secuencia SEC ID nº: 37.

Ventajosamente, el polipéptido según la invención comprende una secuencia polipeptídica de unión entre las secuencias N- y C-terminal.

50 Un segundo objeto de la invención se refiere a un polinucleótido que codifica para un polipéptido tal como el descrito anteriormente.

55 Dicho polinucleótido corresponde a una secuencia de ADN, preferentemente dicho polinucleótido es una secuencia de ADN.

Ventajosamente, dicho polinucleótido codifica para un polipéptido que presenta además un péptido señal en su extremo N-terminal, péptido señal que permite el transporte intracelular de dicho polipéptido hacia los sitios de biosíntesis de los granos de almidón. Preferentemente, dicho péptido señal corresponde al péptido señal de GBSSI del organismo en el que se produce el polipéptido según la invención.

60 A título de ejemplo, se podrá utilizar el péptido señal de GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* (SEC ID nº: 38), cuando se prevé producir el polipéptido según la invención en este organismo.

65 Más ventajosamente, el polinucleótido según la invención está unido de manera operativa a una secuencia de expresión génica que dirige la expresión de dicho polinucleótido en una célula eucariota, preferentemente en una célula de planta, de alga o de microalga. Dicha secuencia de expresión génica corresponde a cualquier secuencia

de regulación, tal como una secuencia promotora o una combinación entre una secuencia promotora y una secuencia activadora que facilita la transcripción y la traducción eficaz del polipéptido tal como el descrito anteriormente. Dicha secuencia de expresión génica puede corresponder a una secuencia promotora vírica o eucariota, constitutiva o inducible. A título de secuencias promotoras que se pueden utilizar, se pueden citar a título de ejemplos, unas secuencias promotoras eucariotas de tipo vegetales superiores, tales como los promotores 35S y CaMV, o unas secuencias promotoras eucariotas de microalgas, tales como los promotores HSP70, Rubisco, ARG7 (arginosuccinato liasa) y NIT1 (nitrato reductasa).

Un tercer objeto de la invención se refiere a un vector que comprende el polinucleótido tal como el descrito anteriormente.

A título de ejemplo de dichos vectores, se pueden citar los plásmidos, los fagos y los plásmidos.

Un cuarto objeto de la invención se refiere a una célula transformada por un vector tal como el descrito anteriormente.

Preferentemente, dicha célula transformada es una célula vegetal que contiene uno o varios polinucleótidos tales como los descritos anteriormente, integrados en su genoma o mantenidos de manera estable en su citoplasma, siendo dichas células vegetales seleccionadas de entre las células de plantas, de algas o de microalgas, capaces de fabricar almidón.

La transformación de células vegetales se puede realizar según unas técnicas bien conocidas por el experto en la materia. A título de ejemplo, se puede citar la técnica de electroporación, de microinyección citoplásmica o nuclear, de cañón de genes o de transformación con la ayuda de bacterias transformadas tal como *Agrobacterium tumefaciens*.

Un quinto objeto de la invención se refiere asimismo a un organismo transformado tal como una planta, un alga o una microalga y que comprende una célula transformada tal como la descrita anteriormente.

Entre las plantas, algas o microalgas transformadas en el marco de la presente invención, se puede citar principalmente el trigo, el maíz, la patata, el arroz, la cebada, el amaranto, las algas del género *Chlamydomonas*, en particular *Chlamydomonas reinhardtii*, las algas del género *Chlorella*, en particular *Chlorella vulgaris*.

Un sexto objeto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido tal como el descrito anteriormente, eventualmente asociado a un soporte farmacéuticamente aceptable.

A título de ejemplo de soporte farmacéuticamente aceptable, la composición puede comprender unas emulsiones, unas microemulsiones, unas emulsiones de aceite en agua, unos lípidos anhidros y unas emulsiones de agua en aceite, y otros tipos de emulsiones.

La composición según la invención puede comprender además uno o varios aditivos tales como los diluyentes, los excipientes, los estabilizantes y los conservantes. Dichos aditivos son bien conocidos por el experto en la materia y se describen en particular en «Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6ª Ed.» (diferentes editores, 1989-1998, Marcel Dekker); y en "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery System" (ANSEL *et al.*, 1994, WILLIAMS & WILKINS).

El polipéptido según la invención puede ser solubilizado en un tampón, en agua o ser incorporado en unas emulsiones o en unas microemulsiones. A título de ejemplo de tampones que se pueden utilizar, se pueden citar el tampón fosfato salino (PBS), el suero artificial (150 mM NaCl en agua) y los tampones Tris.

Existen numerosas causas de inestabilidad o de degradación de los polipéptidos tales como la hidrólisis y la desnaturalización, que pueden provocar una disminución de la inducción de la respuesta humoral o celular. Unos estabilizantes pueden ser añadidos para disminuir o prevenir dichos problemas.

A título de ejemplo de estabilizadores, se pueden citar los monosacáridos, los disacáridos, los polisacáridos, los detergentes iónicos y no iónicos, las sales de metales alcalinos, los fosfolípidos, los ácidos grasos, los polioles y los péptidos estabilizantes tales como el suero albúmina bovina.

Ventajosamente, dicho por lo menos un polipéptido está asociado a unos granos de almidón.

Los inventores han mostrado efectivamente que la producción del polipéptido según la invención en asociación con los granos de almidón permitía aumentar su estabilidad.

La composición según la invención podrá entonces encontrarse en forma administrable por vía parenteral, en particular por vía intravenosa, intraperitoneal o en forma administrable por vía oral.

Preferentemente, la composición farmacéutica mencionada anteriormente administrable por vía parenteral, se caracteriza porque el diámetro de los granos de almidón está comprendido entre 0,1 μm y varios μm , en particular entre aproximadamente 0,1 μm y 10 μm . La proporción en peso de dicho por lo menos un polipéptido en estos granos de almidón está entonces comprendida entre 0,1% y 1% en peso.

5 Unos granos de almidón tales como los descritos anteriormente cuyos diámetros menores están comprendidos entre 0,1 μm y 10 μm , y en los que la proporción en peso de dicho por lo menos un polipéptido tal como el descrito anteriormente está comprendida entre aproximadamente 0,1% y 1% se obtienen ventajosamente:

- 10 - a partir de algas o microalgas transformadas en el marco de la presente invención, se puede citar principalmente *Chlamydomonas reinhardtii*;
- a partir de plantas o células de plantas transformadas en el marco de la presente invención y seleccionadas por sus propiedades para producir naturalmente los granos de almidón mencionados anteriormente, siendo dichas plantas seleccionadas en particular de entre el arroz y el amaranto;
- 15 - a partir de partes de plantas transformadas en el marco de la presente invención, produciendo dichas partes de estas plantas naturalmente los granos de almidón mencionados anteriormente, tales como las hojas de las plantas;
- 20 - a partir de plantas o células de plantas transformadas en el marco de la presente invención, siendo estas plantas seleccionadas de entre unas plantas que comprenden unas mutaciones tales que producen unos granos de almidón de diámetros pequeños mencionados anteriormente, en particular a partir de plantas mutantes descritas en BULEON *et al.* (Int. J. Biol. Macromolecules, vol. 23, p. 85-112, 1998);
- 25 - a partir de plantas o células de plantas transformadas en el marco de la presente invención, siendo estas plantas seleccionadas de entre las plantas transformadas con la ayuda de secuencias nucleotídicas antisentido de la totalidad o de parte del gen que codifica para la ADP-glucosa pirofosforilasa necesaria para la síntesis de ADP-glucosa en las células vegetales, en particular a partir de plantas transformadas descritas en MÜLLER-RÖBER *et al.* (EMBO J., vol. 11(4), p. 1229-1238, 1992).
- 30

Ventajosamente, en el caso de una composición farmacéutica administrable por vía parenteral, los granos de almidón se seleccionan preferentemente de entre los de estructura amorfa en el caso en el que se desea obtener una liberación rápida en la sangre del sujeto del polipéptido que contienen tal como el descrito anteriormente, o, por el contrario, de entre los de estructura cristalina cuando se desea liberar progresivamente dicho polipéptido en la sangre.

35

A título ilustrativo, unos granos de almidón amorfos pueden ser obtenidos a partir de semillas transformadas según la invención en fase de germinación, o a partir de plantas mutantes particulares tales como las descritas por SHANNON y GARWOOD (En starch: Chemistry and Technology, 2ª edición, Academic Press, San Diego, California, p. 16-86, 1984), en particular a partir de los cultivos mutantes tales como "amylose extender" del maíz o también de cualquier cultivo mutante de plantas, algas o microalgas cuyo almidón está enriquecido en amilosa.

40

A título también ilustrativo, unos granos de almidón de estructura cristalina presentan ventajosamente 30 a 35% de cristales y pueden ser obtenidos a partir de semillas de plantas, en particular de cereales, que acaban de ser recogidas y maduras, o a partir de plantas mutantes tales como las descritas por SHANNON y GARWOOD (citado anteriormente, 1984), en particular a partir de los cultivos mutantes tales como "waxy" del maíz o también cualquier cultivo mutante de plantas, algas o microalgas cuyo almidón está desprovisto de amilosa.

45

Dichos granos de almidón podrán ser purificados a partir de las plantas, partes de plantas, algas o microalgas con la ayuda de técnicas bien conocidas por el experto en la materia. A título de ejemplos de dichas técnicas, se pueden citar las técnicas descritas en HARRIS (The Chlamydomonas Sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. Academic Press, San Diego, CA., 1989) y en KINDLE (High-frequency nuclear transformation of Chlamydomonas reinhardtii. Genetics, 87, 1228-1232, 1990).

50

Un séptimo objeto de la invención se refiere a un método de tratamiento profiláctico de una patología asociada a un parásito del género *Plasmodium* que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición tal como la descrita anteriormente a un sujeto.

55

Tal como se utiliza en la presente solicitud, el término "sujeto" corresponde a un mamífero tal como un roedor, un felino, un canino, un primate o un humano, preferentemente dicho sujeto es un humano.

60

Por patología asociada a un parásito del género *Plasmodium* se entiende en particular el paludismo.

Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad que permite inducir la producción de anticuerpos neutralizantes. El experto en la materia podrá determinar dicha cantidad terapéuticamente eficaz en base a sus

65

conocimientos generales y/o con la ayuda de simples experimentos de rutina.

Un octavo objeto de la invención se refiere a la utilización de una composición tal como la descrita anteriormente para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento profiláctico de un sujeto de una patología asociada a un parásito del género *Plasmodium*, preferentemente el paludismo.

Según un modo de realización preferido, dicha composición está destinada a una administración por vía parenteral.

Según otro modo de realización preferido, dicha composición está destinada a una administración por vía oral.

Los ejemplos siguientes se proporcionan a título ilustrativo y no limitan el alcance de la presente invención.

Ejemplos:

15 **I- Producción de proteínas de fusión que comprenden la GBSSI y unos antígenos de parásito del género *Plasmodium***

I-1 Obtención de epítomos derivados de los antígenos MSP1 y AMA-1 de parásitos del género *Plasmodium*

Con el fin de validar este concepto de vacunación antipalúdica, se han seleccionado dos polipéptidos que proceden de los antígenos principales MSP1 y AMA-1 procedentes de parásitos del género *Plasmodium* y que han demostrado su eficacia en unos ensayos de protección contra el parásito (JOHN *et al.*, J. Immunol., vol. 173, p. 666-72, 2004; MALKIN *et al.*, Infect. Immun., vol. 73, p. 3677-85, 2005).

Unas reacciones de PCR con la ayuda de cebadores específicos han permitido amplificar los polinucleótidos que codifican para

- el péptido C-terminal de 19 kDa (desprovisto de la secuencia glicolípida GPI) del antígeno principal de superficie MSP1 (merozoite surface protein 1) de *Plasmodium falciparum* (modelo de infección humana), y
- la región central del antígeno AMA-1 (apical major antigen 1) de *Plasmodium berghei* (modelo de infección murina).

Más específicamente, los cebadores 3' utilizados presentaban un sitio de restricción XhoI y permitían la clonación ulterior en fase del polinucleótido obtenido con la secuencia polinucleotídica que codifica para la GBSSI. Los cebadores 5' presentaban un sitio de restricción BamHI.

Los fragmentos PCR MSP1 y AMA-1 de 312 y 336 pb respectivamente (SEC ID n°: 39 y SEC ID n°: 40) han sido purificados y después clonados en el vector pCR2.1 con la ayuda del kit TOPO TA CLONING® (INVITROGEN) según las instrucciones del fabricante para obtener los plásmidos MSP1-pCR2.1 y AMA-1-pCR2.1 respectivamente.

I-1 Extracción del gen de resistencia *paro*^R del plásmido pSG2 de *chlamydomonas*

Se han digerido 5 µg de plásmido pSG2 durante 2 horas a 37°C con la enzima de restricción XbaI. La banda de ADN de 2.300 pb que corresponde al fragmento que confiere la resistencia a la paromocinina (*Paro*^R) ha sido extirpada y purificada. El fragmento plasmídico restante pSG2 (200 ng) ha sido puesto de nuevo en circulación mediante la T4 DNA ligasa (BIOLABS) a 4°C, una noche, y después 1/5º del producto sirvió para transformar unas bacterias TOP10F' competentes (INVITROGEN) según las instrucciones del fabricante. Con el fin de verificar que las bacterias comprenden efectivamente el plásmido pKB101 (véase la figura 2, la cual indica el sitio de la GBSSI truncada y los sitios de clonación; SEC ID n°: 41) y que el fragmento *paro*^R ha sido realmente retirado, se han seleccionado 4 clones y se han cultivado de nuevo en 5 ml de LB suplementado con ampicilina (50 µg/ml).

El ADN plasmídico ha sido extraído con la ayuda del kit NUCLEOSPIN PLASMID (MACHEREY-NAGEL) según las instrucciones del fabricante, y después digerido por la enzima XbaI, durante 2 horas a 37°C con el fin de verificar la ausencia del fragmento *paro*^R de 23.000 pb en el plásmido.

1-3 Extracción de los injertos MSP1 y AMA-1 de los plásmidos MSP-1-pCRT2.1 y AMA-1-pCR2.1

Las bacterias que contienen el plásmido MSP1-pCR2.1 han sido cultivadas de nuevo en 50 ml de LB que contiene 50 µg/ml de ampicilina. El plásmido ha sido después extraído con el kit HISPEED PLASMID MIDI® (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante. Han sido digeridos 5 µg de plásmidos MSP1-pCR2.1 durante 1 hora a 37°C por la enzima BamHI (BIOLABS), después durante 1 hora a 37°C por XhoI (BIOLABS) según las instrucciones del fabricante. El producto de digestión se ha depositado después sobre gel de agarosa y la banda de ADN de 300 pb que corresponde al fragmento MSP1 se ha purificado, y después enlazado con la enzima T4 DNA ligasa, como antes, en el plásmido pSG2 previamente digerido por Xho/BamHI para obtener el plásmido MSP1-pSG2'. Una quinta parte del producto de unión sirvió entonces para transformar unas bacterias TOP10F' competentes (INVITROGEN)

como antes.

En varios clones positivos procedentes de esta transformación, la presencia del plásmido MSP1-pSG2' ha sido confirmada por PCR y secuenciación directa del ADN.

Se ha utilizado el mismo protocolo sobre el plásmido AMA-1-pCR2.1 para obtener el plásmido AMA1-pSG2', el cual comprende un fragmento de 312 pb que corresponde a 104 aminoácidos de AMA1.

1-4 Inserción del gen de resistencia a la paromomicina (Paro^R) en los plásmidos MSP1-pSG2' y AMA1-pSG2'

El plásmido MSP1-pSG2' (5 µg) ha sido digerido por la enzima de restricción XbaI durante 2 horas a 37°C. La linealización completa del plásmido se ha verificado depositando un alícuota de la digestión sobre gel de agarosa al 1%.

El plásmido MSP1-pSG2' linealizado se ha tratado después con fosfatasa alcalina (ROCHE) y el fragmento paro^R purificado anteriormente (véase I-2) se ha insertado en el plásmido MSP1-pSG2' para obtener el plásmido MSP1-pSG2 con la ayuda de la T4 DNA ligasa (BIOLABS) según las instrucciones del fabricante. Una quinta parte del producto de unión sirvió entonces para transformar unas bacterias TOP10F' competentes (INVITROGEN) y algunos clones positivos han sido digeridos por la enzima XbaI con el fin de verificar la presencia de un injerto de 2.300 pb.

Se ha utilizado el mismo procedimiento para la construcción del plásmido AMA1-pSG2 a partir del plásmido AMA1-pSG2'.

1-5 Transformación del alga *Chlamydomonas* con los plásmidos MSP1-pSG2 y AMA1-pSG2

Una cepa mutante de *Chlamydomonas*, desprovista de GBSS endógeno, ha sido transformada con la ayuda de la técnica de las bolas de vidrio con 1 µg de plásmido MSP1-pSG2 según el protocolo descrito en KINDLE (1990, antes citado).

Brevemente, 300 µl de una suspensión celular que procede de un cultivo en TAP en fase exponencial de crecimiento concentrada 100 veces se agita en un vórtex fuertemente en presencia de un microgramo de ADN durante 15 segundos. Se añaden seiscientos microlitros de TAP y la suspensión celular se extiende sobre la caja (TAP suplementada con paromomicina a 10 µg/ml) para seleccionar los clones que han integrado el plásmido MSP1-pSG2. Los clones resistentes a la paromomicina aparecen en una decena de días a 23 grados y bajo luz continua, y son a continuación cribados con el fin de identificar los clones que expresan la proteína de fusión GBSSI-MSP1 (SEC ID n°: 35).

Se ha utilizado el mismo protocolo con el plásmido AMA1-pSG2 para obtener unos clones que expresan la proteína de fusión GBSSI-AMA-1 (SEC ID n°: 37).

II Expresión de las proteínas GBSSI-MSP1 y GBSSI-AMA-1

El almidón de diferentes clones resistentes y susceptibles de comprender la proteína de fusión GBSSI-MSP1 ha sido purificado tal como se describe en HARRIS (1989, citado anteriormente).

Brevemente, un cultivo de alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* en medio sin carencia (TAP) se centrifuga a 300 rpm durante 10 minutos cuando la densidad celular alcanza 3 a 4 millones de células por ml. El residuo celular se tritura con la ayuda de una prensa de French (10.000 PSI). El lisado se centrifuga a continuación (13.000 rpm, 15 minutos) y se conserva el residuo obtenido que contiene el almidón y los restos celulares. Este residuo se resuspende en percoll (GE HEALTHCARE) al 90% y después se somete a una centrifugación (13.000 rpm, 45 minutos). El residuo de almidón obtenido se lava con agua milliQ dos veces (13.000 rpm, 10 minutos).

La dosificación del almidón se efectúa con la ayuda del kit comercializado por DIFFCHAMP (ENZYPLUS STARCH[®]) y después se alícuota por 10 mg. El almidón puede así ser conservado a 4 grados durante varios meses sin degradación aparente. Las proteínas son después extraídas de aproximadamente 1 mg de almidón para cada clon con 60 µl de tampón de extracción (β-mercaptoetanol al 5% (v/v), SDS al 2% (p/v)) a 100°C durante 5 minutos. Después de la centrifugación a 13.000 g durante 10 minutos, se recupera el sobrenadante y la operación se repite una vez con el residuo. Los dos sobrenadantes son reunidos y cargados sobre dos geles de electroforesis SDS-PAGE. A título de control, las mismas operaciones se efectúan sobre el almidón de una capa de *Chlamydomonas reinhardtii* que expresa la GBSSI salvaje. Uno de los dos geles se colorea con azul de coomassie y el otro se transfiere sobre una membrana de nitrocelulosa (SCHLEICHER & SCHUELL) según las instrucciones del fabricante para análisis en transferencia western con un anticuerpo policlonal dirigido contra el péptido parasitario de 10 kDa de MSP1 y después con un anticuerpo policlonal específico de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*.

El gel coloreado con coomassie reveló la existencia de una banda mayoritaria a aproximadamente 70 kDa para las

algas mutantes transformadas y a aproximadamente 70 kDa para el alga salvaje, lo cual corresponde al tamaño esperado para las proteínas GBSSI-MSP1 y GBSSI respectivamente. En efecto, el péptido C-terminal de la GBSS ha sido suprimido y sustituido por el péptido MSP1, lo cual permite obtener una proteína recombinante de tamaño similar. La diferencia entre los transformantes que expresan la GBSS1.MSP1 y las cepas resistentes que no lo expresan se puede observar por la presencia de una proteína de 70 kDa extraída de los granos de almidón. Además, los resultados han mostrado que dichas proteínas son bien reconocidas por el anticuerpo policlonal dirigido contra la GBSSI. Por el contrario, sólo la proteína mayoritaria expresada en las cepas mutantes y transformadas por el vector MSP1-pSG2 es reconocida por el anticuerpo policlonal dirigido contra el péptido parasitario de 19 kDa de MSP1.

Los resultados han mostrado asimismo que la proteína de fusión GBSS-AMA1 era asimismo expresada con éxito en el almidón de algas transformadas por el vector AMA1-pSG2.

III Producción de anticuerpos policlones dirigidos específicamente contra la proteína de fusión GBSS-MSP1-19:

Se ha utilizado una decena de miligramos de almidón, que contiene la proteína de fusión GBSS-MSP1 y purificado tal como se ha descrito anteriormente, para inmunizar cinco ratones Balb/c con adyuvante completo de Freund seguido de dos recuerdos con adyuvante incompleto con un mes de intervalo cada uno. Dos semanas después de la última inmunización, se han recogido los sueros de los cinco ratones.

En paralelo, y a título de control negativo, se ha utilizado una decena de miligramos de almidón que contiene la GBSS salvaje y purificado tal como antes, para inmunizar cinco ratones Balb/c según el protocolo descrito anteriormente.

Se ha confirmado la existencia de anticuerpos dirigidos contra la proteína de fusión GBSS-MSP1 en el suero colectado mediante un análisis por transferencia western cuyos resultados han mostrado que los sueros obtenidos en los ratones inmunizados con la GBSS-MSP1 reconocen específica y únicamente el antígeno principal de superficie MSP1 de 190 kDa así como sus diferentes péptidos proteolíticos, tales como los péptidos de 70 kDa y de 42 kDa, así como el fragmento membranario de merozoitos infectantes, el péptido de 19 kDa. Tal como se esperaba, los sueros producidos contra la GBSS sola no reconocen ningún antígeno parasitario, lo cual confirma la especificidad del reconocimiento de los antígenos parasitarios que contienen los epítomos del péptido de 19 kDa.

La especificidad del suero policlonal anti-GBSS-MSP1 frente al péptido de 19 kDa de MSP1 ha sido asimismo confirmada mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFA). En efecto, y tal como se esperaba, los resultados han mostrado que dicho suero reconocía específicamente la membrana y la superficie de *Plasmodium falciparum* en el interior de los hematíes infectados mientras que los sueros anti-GBSS solos son totalmente negativos.

Por último, la expresión de una proteína de fusión en el almidón permite por lo tanto no sólo su purificación simple sino también ensayar fácilmente su inmunogenicidad puesto que mediante una simple absorción, el almidón será transformado en el organismo en glucosa y las proteínas antigénicas liberadas durante este proceso se volverán entonces accesibles al sistema inmunitario.

IV Inhibición de la invasión de las hematíes por *Plasmodium falciparum*

Se ha utilizado un cultivo de *Plasmodium falciparum* sincrónico que contiene unos esquizontes. Se han resuspendido 900 microl de hematíes a 50% de hematocrito y 1% de parasitemia que contiene únicamente unos esquizontes en 20 ml de RPMI completo. A continuación, 200 microl de la suspensión han sido distribuidos en cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos y 10, 15 ó 20 microl de suero sano o anti GBSS-MSP1 han sido añadidos en unas series de pocillos que contienen la suspensión parasitaria. Para cada concentración, se han ensayado 4 pocillos.

Los resultados han demostrado que los anticuerpos policlones específicos de la GBSS-MSP1 han inhibido completamente (100% de inhibición) la invasión de los glóbulos rojos por *Plasmodium falciparum*. Por el contrario, los anticuerpos policlones dirigidos contra el almidón solo no han revelado ninguna inhibición de la invasión de los glóbulos rojos por *Plasmodium falciparum*.

Por último, estos resultados demuestran que el almidón que contiene la GBSS-MSP1 puede por lo tanto provocar una respuesta humoral que contiene unos anticuerpos policlones que neutralizan la penetración del *Plasmodium falciparum* en el interior de los glóbulos rojos.

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido del que:

5 la secuencia N-terminal comprende la secuencia polipeptídica de la GBSSI (Granule Bound Starch Synthase I), una secuencia polipeptídica que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos 80% con dicha secuencia polipeptídica de la GBSSI o un fragmento de por lo menos 50 aminoácidos de dicha secuencia polipeptídica de la GBSSI;

10 (i) presentando la secuencia polipeptídica la capacidad de fijarse al almidón; y

(ii) comprendiendo la secuencia C-terminal una secuencia polipeptídica que codifica para por lo menos un epítipo de un antígeno de un parásito del género *Plasmodium* seleccionado preferentemente de entre el grupo constituido por *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium malariae*.

15 2. Polipéptido según la reivindicación 1, caracterizado porque la secuencia polipeptídica de la GBSSI se selecciona de entre el grupo constituido por la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* (SEC ID nº: 1), de trigo (*Triticum aestivum*; SEC ID nº: 2), de maíz (*Zea mays*; SEC ID nº: 3), de guisante (*Pisum sativum*; SEC ID nº: 4), de arroz (*Oriza sativa*; SEC ID nº: 5), de cebada (*Hordeum vulgare*; SEC ID nº: 6), de patata (*Solanum tuberosum*; SEC ID nº: 7), de soja (*Glycine max*; SEC ID nº: 8) y de judía verde (*Phaseolus vulgaris*; SEC ID nº: 9), preferentemente, la secuencia polipeptídica de la GBSSI corresponde a la secuencia polipeptídica de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* (SEC ID nº: 1).

25 3. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque los fragmentos de GBSSI capaces de unirse al almidón se seleccionan de entre el grupo constituido por la secuencia polipeptídica comprendida entre las posiciones 1 y 438 de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* (SEC ID nº: 1), 1 y 449 de la GBSSI de trigo (*Triticum aestivum*; SEC ID nº: 2), 1 y 437 de la GBSSI de maíz (*Zea mays*; SEC ID nº: 3), 1 y 432 de la GBSSI de guisante (*Pisum sativum*; SEC ID nº: 4), 1 y 436 de la GBSSI de arroz (*Oriza sativa*; SEC ID nº: 5), 1 y 437 de la GBSSI de cebada (*Hordeum vulgare*; SEC ID nº: 6), 1 y 434 de la GBSSI de patata (*Solanum tuberosum*; SEC ID nº: 7), 1 y 435 de la GBSSI de soja (*Glycine max*; SEC ID nº: 8) y 1 y 431 de la GBSSI de judía verde (*Phaseolus vulgaris*; SEC ID nº: 9).

35 4. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque dicho antígeno se selecciona de entre el grupo constituido por los antígenos Pfg27/25 (SEC ID nº: 10), Pfs16 (SEC ID nº: 11), Pfs25 (SEC ID nº: 12), Pfs28 (SEC ID nº: 13), Pfs48/45 (SEC ID nº: 14), Pfs230 (SEC ID nº: 15), CSP-1 (SEC ID nº: 16), STARP (SEC ID nº: 17), SALSA (SEC ID nº: 18), SSP-2 (SEC ID nº: 19), LSA-1 (SEC ID nº: 20), EXP-1 (SEC ID nº: 21), LSA-3 (SEC ID nº: 22), RAP-1 (SEC ID nº: 23), RAP-2 (SEC ID nº: 24), SERA-1 (SEC ID nº: 25), MSP-1 (SEC ID nº: 26), MSP-2 (SEC ID nº: 27), MSP-3 (SEC ID nº: 28), MSP-4 (SEC ID nº: 29), MSP-5 (SEC ID nº: 30), AMA-1 (SEC ID nº: 31), EMP-1 (SEC ID nº: 32) et EBA-175 (SEC ID nº: 33), preferentemente, dicho antígeno corresponde al antígeno MSP1 (SEC ID nº: 26) o al antígeno AMA-1 (SEC ID nº: 31).

45 5. Polipéptido según la reivindicación 4, caracterizado porque dicho epítipo presenta una secuencia polipeptídica de por lo menos 6 aminoácidos, preferentemente de por lo menos 8 aminoácidos, derivada de la secuencia polipeptídica de dicho antígeno y preferentemente dicho epítipo consiste en una secuencia polipeptídica que presenta un porcentaje de identidad de por lo menos 70%, preferentemente de por lo menos 80% con la secuencia polipeptídica de dicho antígeno.

50 6. Polipéptido según la reivindicación 5, caracterizado porque la secuencia polipeptídica del epítipo comprende unas sustituciones con respecto a la secuencia polipeptídica de dicho antígeno, con el fin de mejorar el anclaje y así la presentación del polipéptido que corresponde a dicho epítipo por las moléculas de CMH de clase II.

55 7. Polipéptido según la reivindicación 5, caracterizado porque dicho antígeno corresponde al antígeno MSP1 (SEC ID nº: 26) y porque la secuencia polipeptídica que codifica para por lo menos un epítipo de dicho epítipo es la secuencia SEC ID nº: 34, preferentemente dicho polipéptido presenta la secuencia SEC ID nº: 35.

8. Polipéptido según la reivindicación 5, caracterizado porque dicho antígeno corresponde al antígeno AMA-1 (SEC ID nº: 31) y porque la secuencia polipeptídica que codifica para por lo menos un epítipo de dicho antígeno es la secuencia SEC ID nº: 36, preferentemente dicho polipéptido presenta la secuencia SEC ID nº: 37.

60 9. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque comprende una secuencia polipeptídica de unión entre las secuencias N- y C-terminales, preferentemente dicha secuencia de unión comprende un sitio de escisión peptídica que permite liberar el epítipo después de la purificación de dicho polipéptido según la invención.

65 10. Polinucleótido que codifica para un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Vector que comprende un polinucleótido según la reivindicación 10.

12. Célula transformada por un vector según la reivindicación 11.

5 13. Organismo, con la excepción del ser humano, transformado, caracterizado porque comprende una célula según la reivindicación 12.

10 14. Composición farmacéutica que comprende por lo menos un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, eventualmente asociado a un soporte farmacéuticamente aceptable, estando dicho polipéptido preferentemente asociado a unos granos de almidón.

15 15. Utilización de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento profiláctico de un sujeto de una patología asociada a un parásito del género *Plasmodium*, preferentemente del paludismo.

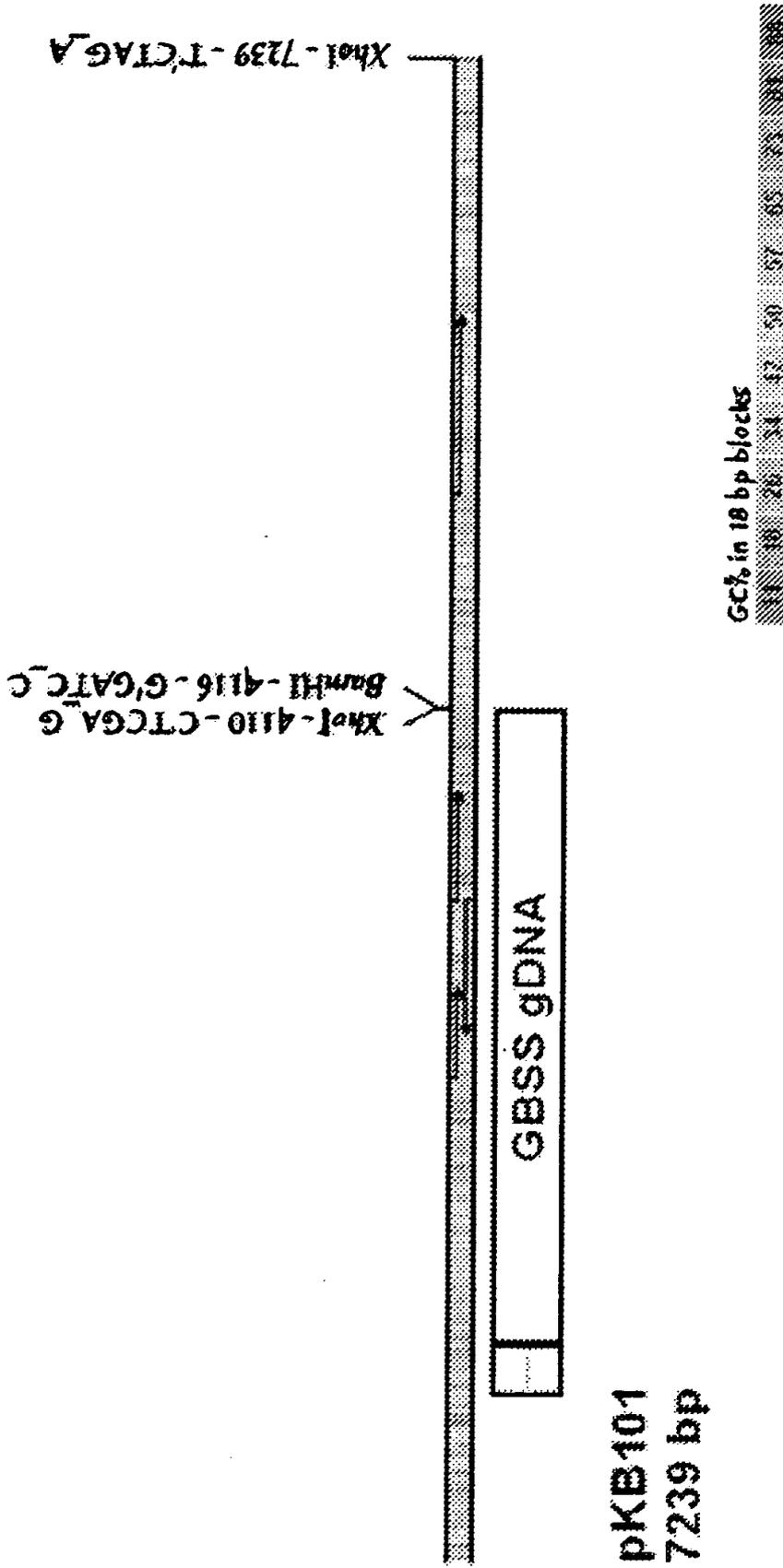


Figura 2