

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 066**

51 Int. Cl.:
G01N 33/536 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03789967 .1**
96 Fecha de presentación: **20.11.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1563301**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.08.2005**

54 Título: **VACUNA PARA LA PREVENCIÓN DEL PALUDISMO.**

30 Prioridad:
20.11.2002 US 427911 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.12.2011

73 Titular/es:
SANARIA INC.
9800 MEDICAL CENTRE DRIVE- A209
ROCKVILLE, MD 20852, US

72 Inventor/es:
HOFFMAN, Stephen, L y
LUKE, Thomas, C

74 Agente: **Jorda Petersen, Santiago**

ES 2 371 066 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

Vacuna para la prevención del paludismo.

5 **Campo de la invención**

La presente solicitud se refiere a la prevención del paludismo mediante la administración de una vacuna. Más particularmente, la presente invención se refiere a una vacuna contra la infección por paludismo que comprende la administración de esporozoitos atenuados a un humano o animal.

10

Introducción y descripción de la técnica anterior

El paludismo es una enfermedad que afecta a entre 300 y 500 millones de personas, causa entre uno y tres millones de muertes al año y tiene un enorme impacto económico en los países en desarrollo, especialmente en el África subsahariana [1, 2]. El *Plasmodium falciparum* es el organismo responsable de la mayoría de muertes por paludismo que se producen en todo el mundo. La Organización Mundial del Turismo ha informado de que, de los casi 700 millones de desplazamientos turísticos internacionales registrados en todo el mundo durante el año 2000, aproximadamente 9 millones tuvieron como destinación África Occidental, África Central y África Oriental, 37 millones correspondieron al Sudeste Asiático, 6 millones al sur de Asia y 10 millones a Oceanía [3]. Se calcula que más de 10.000 viajeros procedentes de América del Norte, Europa y Japón contraen paludismo cada año. Durante más de cien años, en todas las campañas militares en las que se ha transmitido el paludismo, el ejército de los EE.UU. ha sufrido más bajas por causa de esta enfermedad que por el fuego enemigo. Se calcula que debido al paludismo se perdieron 12.000.000 de jornadas laborales durante la Segunda Guerra Mundial y 1,2 millones durante el conflicto de Vietnam [4].

25

La transmisión del parásito *Plasmodium* (el parásito protozoario que causa el paludismo) se produce a través de la picadura de una hembra de mosquito *Anopheles* infectada, cuyo periodo de actividad comprende el atardecer y el amanecer. Los esporozoitos migran a través del torrente sanguíneo desde el lugar de la picadura hasta el hígado, donde se multiplican dentro de los hepatocitos, produciendo, en el caso del *P. falciparum*, entre 10.000 y 40.000 descendientes por célula infectada. En esta fase hepática, los parásitos expresan un conjunto de antígenos que no se expresan en los esporozoitos. Esta nueva generación de parásitos vuelve a penetrar en el torrente sanguíneo en forma de merozoitos, que expresan un conjunto de antígenos diferentes de los expresados en las fases esporozoítica y hepática temprana, e invaden los eritrocitos, donde una multiplicación adicional incrementa el número de parásitos en un factor comprendido entre aproximadamente 10 y 20 cada 48 horas. A diferencia del desarrollo de entre cinco y diez días en el hígado, que no produce ningún síntoma ni señales de enfermedad, la infección en fase sanguínea sin tratar causa hemólisis, escalofríos, fiebre alta y postración. En el caso de la *P. falciparum*, la más peligrosa de las cuatro especies de *Plasmodium* que infectan a los seres humanos, la enfermedad presenta como complicaciones la alteración del flujo sanguíneo microcirculatorio y cambios metabólicos en órganos vitales tales como el cerebro, el riñón y el pulmón, que con frecuencia conducen a la muerte si no se tratan urgentemente.

40

Encontrar una vacuna eficaz contra el paludismo causado por *P. falciparum* sigue siendo uno de los grandes retos de la medicina. A pesar de los más de cien años de esfuerzos y los cientos de millones de dólares invertidos en investigación, de la dedicación de toda una vida de muchos médicos y científicos esforzados y de las muchas y prometedoras vacunas experimentales anunciadas, actualmente no se comercializa ninguna vacuna que puede aliviar una de las grandes plagas infecciosas de la humanidad. Hace una generación, las iniciativas de salud pública con utilización de cloroquina, DDT y programas de control de vectores parecían llamadas a reducir la amenaza mundial del paludismo por *P. falciparum* a la insignificancia. La falta de una vacuna eficaz dificultó dichos esfuerzos, pero el control continuado de la enfermedad parecía inminente.

45

Finalmente, las promesas de éxito próximo resultaron efímeras, debiéndose dicho fracaso a múltiples factores. Los parásitos resultaron cada vez más resistentes a los fármacos antipalúdicos asequibles y muy eficaces, las medidas de control de vectores prescribieron y las migraciones, las guerras y la penuria económica se hicieron cada vez más comunes en las zonas endémicas de los países en desarrollo. A consecuencia de todo ello, el paludismo por *P. falciparum* ha experimentado un rebrote: cada año pone en situación de riesgo a 2.500 millones de personas, provoca entre 300 y 900 millones de infecciones y causa la muerte de entre 1 y 3 millones de personas. Cada vez se contempla más el paludismo por *P. falciparum* a la vez como una causa y como una consecuencia cruel de los muchos problemas sociales, económicos, ambientales y políticos que azotan a los países en desarrollo, y se considera un serio impedimento para resolver todos estos complejos problemas. Quizá sea posible controlar el paludismo por *P. falciparum* en los países desarrollados sin una vacuna eficaz. En la práctica, dada la realidad social, política y económica, en el contexto de la presente invención se cree que una vacuna puede ser un componente esencial de un programa de control continuado y que la misma resultará necesaria para una campaña mundial de erradicación.

55

En este contexto, el período moderno en el desarrollo de la vacuna contra el paludismo ha resultado especialmente frustrante. Desde principios de 1980, se han producido espectaculares avances tecnológicos en biología molecular y

60

65

5 medicina. Estos avances han acelerado la identificación de proteínas y epítomos de *P. falciparum* específicos de fase, así como los mecanismos y respuestas inmunitarias del huésped. Este conocimiento se ha traducido en una serie de nuevas vacunas experimentales [5, 6]. En cierto sentido, esta época moderna ha constituido la época dorada de la investigación de la vacuna contra el paludismo y los ensayos en humanos. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos titánicos llevados a cabo por los investigadores del paludismo, la mayor parte de estas vacunas no han logrado proporcionar ningún tipo de inmunidad protectora en los seres humanos, y únicamente en una se ha demostrado una protección a corto plazo reproducible contra la infección en el 40%-70% de los receptores [7-9].

10 Con tiempo y recursos suficientes, estas estrategias de vacunación u otras aún por desarrollarse pueden conducir finalmente a una vacuna consistente. Sin embargo, en una reciente sesión de los Keystone Symposia titulada "Malaria's Challenge: From Infants to Genomics to Vaccines" [6] se preguntó a los participantes cuándo creían que se podría "lanzar" la vacuna contra el paludismo como producto comercial. Muchos de los presentes opinaron que la primera vacuna no saldría hasta entre 2016 y 2025. El responsable de las investigaciones de Glaxo Smith Kline (GSK) para desarrollar una vacuna de proteína de circunsporozoito de *P. falciparum* (PfCSP) recombinante fue quien expresó un mayor optimismo. Declaró que, si todo iba bien, esta vacuna de proteína única podría "lanzarse" al mercado al cabo de 7 u 8 años (entre 2009 y 2010). Teniendo en cuenta que tanto GSK como el ejército de los EE.UU. han estado trabajando en una vacuna de proteína recombinante PfCSP desde la clonación de la PfCSP en 1984 [10], y que muchos expertos en paludismo han expresado sus dudas en cuanto a la posibilidad de que una vacuna de proteína única resulte suficiente para controlar el paludismo de forma continuada, la expectativa mencionada de más de 25 años para el desarrollo de una vacuna de proteína única ofrece una perspectiva desalentadoramente realista sobre las posibilidades de desarrollar vacunas que reduzcan realmente los estragos de esta enfermedad.

25 Inmunidad protectora tras inmunización con esporozoitos atenuados mediante radiación: En 1967, Nussenzweig documentó que la administración intravenosa de esporozoitos de *P. berghei* atenuados mediante radiación a ratones A/J los protegía de la provocación con esporozoitos infecciosos de *P. berghei* [11]. Estos estudios en roedores proporcionaron el impulso para llevar a cabo estudios en humanos y, a principios de 1970, dos grupos de trabajo establecieron que la inmunización de voluntarios humanos mediante picaduras de mosquitos irradiados portadores de esporozoitos de *P. falciparum* en sus glándulas salivales era capaz de protegerlos contra la provocación con esporozoitos de *P. falciparum* plenamente infecciosos [12-19]. Estos estudios demostraron que era posible conseguir una vacuna contra el paludismo que ofreciera inmunidad protectora estéril. Sin embargo, la única manera de producir esporozoitos en ese momento era infectar a un voluntario con *P. falciparum*, tratarlo con dosis de cloroquina para reprimir el parásito, aunque sin eliminarlo, permitir el desarrollo de gametocitos y, a continuación, dejar que los mosquitos picaran a dicho voluntario. Incluso si hubiera sido posible producir esporozoitos en un número suficiente por este método, se consideró clínica, técnica y logísticamente inviable inmunizar seres humanos con una vacuna de esporozoitos irradiados. En gran parte, esto fue debido a que los esporozoitos se tenían que administrar vivos, ya fuera mediante la picadura de mosquitos infectados o por inyección intravenosa, tal como se hacía en los ratones. Los científicos que trabajaban en este campo llegaron a la conclusión de que otras vías de inmunización no proporcionarían una protección adecuada o comparable con la inmunización por inyección intravenosa o por la picadura de mosquitos infectados; en esencia, pues, desde su punto de vista quedaba descartada la utilización de esporozoitos atenuados como vacuna. A continuación se citan las opiniones publicadas de algunos de estos científicos.

45 "Esta observación corrobora publicaciones anteriores (Nussenzweig, Vanderberg y Most, 1967 y 1969) y extiende sus conclusiones. Los grupos de ratones inmunizados por otras vías parenterales (intramuscular, intraperitoneal e intracelomática) mostraron un nivel general de protección mucho menor que los ratones inmunizados por vía intravenosa." [20]

50 "Estos estudios confirmaron un estudio anterior que demostraba que los esporozoitos irradiados de *P. berghei* inyectados por vía intramuscular son mucho menos eficaces que los inyectados por vía intravenosa para conseguir una inmunización protectora de los ratones contra el paludismo inducido por esporozoitos. La principal limitación que impedía la extensión a ensayos en humanos era el requisito de inmunización por vía intravenosa, un procedimiento que planteaba unos riesgos médicos inaceptables." (En el estudio mencionado en esta cita, la protección por vía intramuscular estaba comprendida entre el 11% y el 42% y la protección por vía subcutánea era del 0%) [21].

55 "Además, se ha demostrado que, de las distintas vías de inmunización utilizadas en los intentos de vacunación de roedores (intramuscular, intravenosa, subcutánea, oral, etc.), la vía intravenosa ha proporcionado el grado más elevado de protección y los resultados más reproducibles. La única otra vía de inmunización muy eficaz es la picadura de mosquitos infectados e irradiados". [22]. En esta publicación de 1980, "Use of Radiation-attenuated Sporozoites in the Immunoprophylaxis of Malaria", el doctor Nussenzweig comenta la posibilidad de desarrollar una vacuna de esporozoitos contra el paludismo, y concluye: "En definitiva, los recientes descubrimientos parecen indicar que ahora ya disponemos de las potentes herramientas necesarias que deberían proporcionarnos los medios para dilucidar el mecanismo de inmunidad inducida por esporozoitos y aislar los antígenos protectores. En estas condiciones, los diversos obstáculos para el desarrollo de una vacuna de esporozoitos contra el paludismo parecen superables, esperemos que en un futuro no muy remoto." El doctor Nussenzweig no considera la idea de utilizar una vacuna de esporozoitos completos atenuados como una alternativa razonable, sino únicamente la utilización de

esporozoitos para proporcionar los componentes de una vacuna que induzca inmunidad contra la fase de esporozoito.

5 En 1980, después de casi 15 años de trabajo sobre el modelo de vacuna de esporozoitos irradiados, el indiscutido mayor experto en este campo, el doctor Nussenzweig, llegó a la conclusión de que el camino hacia una vacuna pasaba por la ciencia moderna: por la comprensión de los mecanismos inmunológicos de protección y las dianas antigénicas de dichas respuestas inmunitarias protectoras, y por la construcción de una vacuna de "subunidades" de esporozoitos. Desde entonces, no apareció prácticamente ninguna mención ni consideración en la bibliografía sobre ningún intento de desarrollar una vacuna de esporozoitos parásitos completos atenuados como una vacuna práctica para los humanos por muchas razones, una de las cuales, y no la menos importante, era que, a pesar de esos 15 años de investigación, ningún científico había descubierto una manera razonable de administrar esporozoitos que no fuera por vía intravenosa o mediante la picadura de mosquitos infectados.

15 Tampoco prosiguió el esfuerzo por desarrollar una vacuna de esporozoitos atenuados, ya que dichos esporozoitos tendrían que cultivarse en mosquitos asépticos, purificarse asépticamente y conservarse y reconstituirse adecuadamente antes de su administración, y después de dicho tratamiento aún tendrían que poder provocar respuestas inmunitarias protectoras tras su administración.

20 Se estaba informando de posibles soluciones a partes de los problemas de producción, aunque en ese momento no se relacionaron con el desarrollo de una vacuna de esporozoitos atenuados. En 1975 se informó de un método para cultivar *P. falciparum in vitro* [23, 24], seguido en 1982 por un método para producir gametocitos a partir de dichos cultivos [24]. En 1986, se informó de que los seres humanos podían resultar infectados por los esporozoitos producidos en mosquitos que se habían alimentado de estos cultivos *in vitro* [26]. En consecuencia, existía una manera de producir esporozoitos exenta de las dificultades de la producción *in vivo* de gametocitos en humanos. Por sí solos, estos desarrollos no eran suficientes para superar todos los obstáculos planteados por el desarrollo de la vacuna de esporozoitos atenuados. No existía ninguna forma de producir suficientes esporozoitos o de producir y procesar los esporozoitos en condiciones que cumplieran la regulación. Además, no existían datos que indicaran que los esporozoitos adecuadamente producidos y procesados pudieran ser administrados con éxito de un modo clínicamente aceptable y práctico.

30 De este modo, tras el fracaso de la comunidad científica dedicada al paludismo en descubrir un método para administrar esporozoitos atenuados de un modo clínicamente aceptable y práctico, y en cantidad suficiente para alcanzar una protección elevada, la vacuna de esporozoitos atenuados desapareció de la consideración clínica y los científicos, tal como había presagiado el doctor Nussenzweig (párrafo [012] anterior) contempló la ciencia molecular moderna con la esperanza de desarrollar una vacuna. Diversos avances prometedores iniciaron una era moderna en el desarrollo de vacunas de subunidades contra el paludismo. Ya se había producido un anticuerpo monoclonal contra la principal proteína de superficie de los esporozoitos, la proteína del circunsporozoito (CSP), y se había puesto de manifiesto que dicho anticuerpo protegía a los ratones en experimentos de transferencia pasiva [27]. Además, se había clonado y secuenciado el gen que codifica la proteína PfCSP [10]. Al mismo tiempo, se desarrolló y comercializó la primera vacuna de proteína recombinante purificada, la vacuna de antígeno de superficie de la hepatitis B [28]. El peso de los indicios y tendencias en la ciencia de las vacunas parecía ofrecer a los investigadores del paludismo una hoja de ruta para el rápido desarrollo de una vacuna antipalúdica para humanos. Dado que se había considerado impracticable la producción y administración de la vacuna de esporozoitos, el retorno a una vacuna de parásitos completos atenuados parecía innecesario y anticuado, y todos los esfuerzos posteriores se centraron en la esperanza de desarrollar vacunas de subunidades.

50 En 1987, cuando las primeras vacunas de proteína recombinante [29] y de péptido sintético [30] resultaron menos protectoras de lo esperado, en lugar de intentar desarrollar una vacuna de esporozoitos atenuados, cuya producción y administración se consideraba impracticable, los científicos se centraron en la comprensión de los mecanismos inmunológicos responsables de la inmunidad protectora y de las dianas antigénicas de dichas respuestas inmunitarias protectoras, así como en el desarrollo de vacunas de subunidades y de sistemas de administración de vacunas que indujeran dicha protección. Gran parte de estos trabajos básicos se llevaron a cabo en los sistemas modelo de *P. berghei* y *P. yoelii* en roedores. Estos estudios sobre el paludismo en roedores aportaron conocimientos importantes sobre los mecanismos inmunológicos y las dianas antigénicas de la protección inducida por las vacunas de esporozoitos irradiados y condujeron al desarrollo de una serie de vacunas experimentales [31-33]. Ninguno de dichos estudios, llevados a cabo tras la clonación en 1984 del gen que codifica la proteína de circunsporozoito de *P. falciparum* (PfCSP) y hasta el fin del milenio, sugirió la posibilidad de desarrollar una vacuna de esporozoitos completos irradiados para humanos, ya que ninguno de los investigadores pensó que fuera posible producir o administrar una vacuna de este tipo de un modo practicable. Curiosamente, se ha demostrado que las formulaciones de vacuna de subunidades (proteína recombinante, péptido sintético, virus recombinante, plásmido de ADN) producen una protección excelente en los ratones, pero sin parangón en los seres humanos. En cambio, la protección en ratones mediante la administración intravenosa de esporozoitos irradiados [11] condujo a la realización de estudios en humanos que demostraron que la exposición a las picaduras de mosquitos con esporozoitos irradiados de *P. falciparum* en sus glándulas salivales inducía protección [34].

65 En 1989, tras una serie de desalentadores ensayos clínicos con vacunas de subunidades PfCSP, se inició en el

Naval Medical Research Institute, más tarde denominado Naval Medical Research Center (NMRI y NMRC, respectivamente), y en el Walter Reed Army Institute of Research (WRAIR) la inmunización de voluntarios mediante la picadura de mosquitos portadores de esporozoitos de *P. falciparum* en sus glándulas salivales posteriormente atenuados por exposición *in vivo* a radiación gamma. El objetivo de estos estudios consistía en definir mejor las características y necesidades clínicas que conducen a la protección de los seres humanos con la vacuna de esporozoitos irradiados, evaluar las respuestas inmunitarias protectoras generadas en los humanos e identificar los antígenos y epítomos de las proteínas que provocan la respuesta inmunitaria. El objetivo nunca consistió en desarrollar esporozoitos irradiados como vacuna para humanos, dado que se consideraba completamente impracticable y técnicamente inviable producir y administrar una vacuna de este tipo. Se publicaron los resultados clínicos preliminares y los resultados de los extensos ensayos inmunológicos [35-41]. Dichos estudios inmunológicos, combinados con los de otros investigadores en este mismo ámbito [42-48], aumentaron la comprensión de las respuestas inmunológicas en los seres humanos inmunizados con esporozoitos de *P. falciparum* atenuados mediante radiación. Sin embargo, no se consideró ni se mencionó la posibilidad de desarrollar una vacuna de esporozoitos atenuados.

Los resultados de los primeros 10 años de experiencia clínica con estas inmunizaciones y provocaciones han sido publicados recientemente y se han combinado con todos los informes clínicos sobre la inmunización de seres humanos con esporozoitos de *Plasmodium* irradiados [34] publicados por la Universidad de Maryland (de los años 1970, finales de 1980 y principios de 1990), el Rush-Presbyterian-St. Luke's Medical Centre de Chicago y el Naval Medical Research Institute durante los años 1970 [12-19, 34]. El análisis de los datos arrojó una serie de observaciones.

A). Se puso de manifiesto una respuesta a la dosis con respecto a la inmunidad protectora entre los voluntarios provocados por la picadura de 5-14 mosquitos infectados. Trece de 14 voluntarios (93%) inmunizados por las picaduras de más de 1.000 mosquitos infectados irradiados quedaron protegidos contra el desarrollo de la infección por *P. falciparum* en fase sanguínea cuando fueron provocados dentro de un plazo de 10 semanas desde su última inmunización primaria. Hubo 35 provocaciones de estos voluntarios y se observó una protección completa contra el desarrollo de la infección en fase sanguínea en 33 de los 35 casos (94%). Cuatro de 10 voluntarios (40%) inmunizados por la picadura de más de 200 y menos de 1.000 mosquitos infectados irradiados quedaron protegidos contra el desarrollo de la infección por *P. falciparum* en fase sanguínea cuando fueron provocados dentro de un plazo de 10 semanas desde su última inmunización primaria, un nivel de inmunidad protectora significativamente menor que el encontrado en los voluntarios inmunizados con > 1.000 picaduras infecciosas ($p = 0,0088$, prueba exacta de Fisher, bilateral). Hubo 15 provocaciones de los voluntarios inmunizados con menos de 1.000 picaduras infecciosas, y se produjo una protección completa contra el desarrollo de infección en fase sanguínea en 5 de los 15 casos (33%), un nivel de inmunidad protectora significativamente menor que el que se encuentra entre los voluntarios inmunizados con > 1.000 picaduras infecciosas ($p = 0,0088$, prueba exacta de Fisher, bilateral).

B). La inmunidad protectora duró por lo menos 42 semanas (10,5 meses). Cinco de 6 de los 14 voluntarios anteriores, tras ser provocados entre 23 y 42 semanas (23, 36, 39, 41 y 42 semanas) después de su última inmunización primaria o secundaria, estaban protegidos contra la provocación experimental. A excepción de una única provocación de un voluntario cinco años después de la última inmunización (no protegido), no hubo otras provocaciones que evaluaran la longevidad de la inmunidad protectora.

C). La protección no era específica de la cepa. Cuatro voluntarios fueron provocados con cepas de *P. falciparum* diferentes de las cepas con las que habían sido inmunizados. Estos cuatro voluntarios estaban completamente protegidos en siete de las siete provocaciones con diferentes cepas de *P. falciparum*.

D). La memoria inmunológica dura por lo menos 5 años. Un voluntario que había estado expuesto a la picadura de 1.601 mosquitos infectados irradiados y se había mostrado protegido ante las provocaciones llevadas a cabo 9 y 42 semanas después de la última exposición, no se mostró protegido cuando se volvió a provocar 5 años después de la última exposición a los mosquitos infectados irradiados. Se le trató el paludismo, se le practicó una inmunización de recuerdo mediante exposición a 147 mosquitos infectados irradiados y se le volvió a practicar una provocación por exposición a la picadura de 5 mosquitos infectados no irradiados con esporozoitos de *P. falciparum*. Este voluntario se mostró protegido contra dicha provocación infecciosa [34], lo que demuestra que la inmunidad protectora se podía renovar con una única exposición a esporozoitos irradiados.

Así, la protección se alcanzó en más del 90% de los experimentos de provocación tras más de 1.000 picaduras de mosquito, duró como mínimo 10,5 meses y no era específica de la cepa de *P. falciparum*.

Una vacuna de "subunidades" que demostrara este nivel de eficacia protectora en seres humanos sería considerada un avance enorme. Aunque se observaba sistemáticamente que la protección surgía de esta vacuna experimental de esporozoitos irradiados, el poder absoluto de los esporozoitos atenuados permaneció desconocido hasta la finalización del cuidadoso análisis necesario para publicar este estudio. Curiosamente, cuando uno de los presentes inventores (SLH) presentó estos resultados en la sesión de los Keystone Symposia de marzo de 2002 titulada "Malaria's Challenge: From Infants to Genomics to Vaccines", los mismos se consideraron interesantes, pero

ninguno de los presentes planteó siquiera la idea de que este enfoque debiera proseguirse como una vacuna viable contra el paludismo, ya que todo el mundo pensaba que la producción de la vacuna era impracticable y su administración, imposible. Este punto de vista todavía está muy extendido entre la comunidad científica. En una publicación reciente de la revista *Nature* (2 de octubre de 2003) [49], el director de ensayos clínicos del programa de paludismo del Naval Medical Research Center declaró: “Las barreras han parecido lo suficientemente desalentadoras para que nadie se haya mostrado dispuesto a darle una oportunidad”, y un experto en vacunas contra el paludismo de la University of Oxford (Reino Unido) afirmó: “Es muy complicado [...]. Vale la pena intentarlo, pero las probabilidades son muy escasas”. Por el contrario, los presentes inventores creyeron que era posible hacer una vacuna de este tipo, pero había varias cuestiones críticas que había que resolver antes de pasar a la fabricación según las prácticas correctas GMP y los ensayos clínicos. Dichas cuestiones se resumen en una publicación reciente [50]. Uno de los aspectos más críticos consistía en determinar si se podían administrar esporozoitos atenuados por una vía práctica para alcanzar una vacuna destinada a los humanos.

Sumario de la invención

Hasta la actualidad, se había considerado impracticable inmunizar humanos con esporozoitos atenuados de especie *Plasmodium*, ya que los mismos tenían que ser administrados para la inmunización mediante la picadura de mosquitos infectados irradiados o por inyección intravenosa, ya que esto era lo que se había hecho anteriormente con los seres humanos y los ratones, respectivamente, y la comunidad científica lo aceptaba como la única manera de alcanzar un nivel elevado de inmunidad protectora.

Se ha propuesto la hipótesis de que, cuando los esporozoitos adecuadamente irradiados se administran mediante picadura de mosquito o inyección intravenosa, circulan a través del torrente sanguíneo hasta el hígado, invaden los hepatocitos, se desarrollan parcialmente y, a continuación, detienen su desarrollo, no alcanzando nunca el estado de esquizonte hepático maduro, que se rompe y libera merozoitos que provocan la infección de los eritrocitos y la enfermedad conocida como paludismo. En consecuencia, están atenuados. Los datos indican que, a fin de desencadenar respuestas inmunitarias protectoras adecuadas, los parásitos tienen que invadir los hepatocitos, desarrollarse parcialmente y expresar nuevas proteínas, que son las dianas de la respuesta inmunitaria protectora, particularmente de las células T CD8.

Se ha propuesto la hipótesis de que existe una relación/asociación directa entre la infectividad de una preparación de esporozoitos no irradiados y su capacidad para provocar inmunidad protectora cuando están atenuados. Además, se ha propuesto también la hipótesis de que existe una relación/asociación directa entre la infectividad de los esporozoitos no irradiados cuando se administran por un método particular y la capacidad de dichos esporozoitos para provocar inmunidad protectora cuando se irradian y se administran por dicho método.

La presente invención descrita en la presente memoria, se descubrió como respuesta a la pregunta: ¿Se pueden administrar esporozoitos atenuados por una ruta que sea práctica para una vacuna destinada al ser humano?

La cuestión se abordó utilizando el parásito de paludismo de roedor *P. yoelii*, no el parásito de paludismo de roedor *P. berghei*, que ya había sido estudiado en todas las publicaciones citadas anteriormente (11, 20-22). El sistema modelo de *P. berghei* se utilizó para establecer que los esporozoitos irradiados protegen a los ratones A/J, hecho que condujo a los estudios en humanos que demuestran que la exposición a mosquitos infectados con *P. falciparum* irradiados protege a los seres humanos. El sistema *P. berghei* también se utilizó para demostrar a la comunidad científica que la administración intramuscular, subcutánea y por otras vías no intravenosas de esporozoitos irradiados no es adecuadamente protectora en los ratones (20-22). De hecho, tras la administración subcutánea de esporozoitos atenuados mediante radiación, la protección fue del 0% [21]. Estos estudios, llevados a cabo principalmente en ratones A/J, condujeron a la conclusión de que no era posible desarrollar esporozoitos irradiados en forma de vacuna antipalúdica práctica y clínicamente significativa para los seres humanos. A principios y mediados de los años ochenta, el Naval Medical Research Institute pasó de trabajar con *P. berghei* en ratones A/J a trabajar con *P. yoelii* en ratones Balb/c. Esto se debió a que los científicos del Naval Medical Research Institute consideraron que la administración intravenosa de *P. yoelii* en ratones Balb/c predecía mejor el comportamiento de la infección por *P. falciparum* en humanos que la administración intravenosa de *P. berghei*. En gran parte, esto se debía a que los esporozoitos de *P. yoelii* administrados por vía intravenosa son mucho más infecciosos para los ratones que los esporozoitos de *P. berghei* administrados por vía intravenosa. La dosis infecciosa 50% en ratones para la administración intravenosa de *P. yoelii* a ratones Balb/c es aproximadamente 100-1.000 veces menor que la dosis infecciosa 50% de *P. berghei* en ratones Balb/c, y casi con toda seguridad más comparable que *P. berghei* a la dosis infecciosa 50% de los parásitos *Plasmodium sp.* en primates, tales como *P. knowlesi* en monos y *P. falciparum* en humanos. A principios de 1990, aproximadamente 10 años después de que el grupo del comenzara a trabajar con *P. yoelii* en lugar de *P. berghei*, el doctor Nussenzweig, tras leer algunas publicaciones y escuchar conferencias de algunos científicos de dicho grupo, pidió los parásitos *P. yoelii* utilizados por dicho laboratorio a uno de los presentes inventores (SLH) y, básicamente, dirigió el trabajo de su grupo de investigación de la New York University sobre el paludismo en roedores hacia el sistema modelo de *P. yoelii*, centrándose sobre todo en los ratones Balb/c.

Es importante destacar que todo el trabajo con *P. yoelii* se ha centrado en la administración mediante inyección intravenosa o picadura de mosquito, casi con toda seguridad debido al trabajo previo en el sistema modelo de *P.*

berghei descrito anteriormente [11, 20-22]. Además, debido a dichos trabajos llevados a cabo con el sistema modelo de *P. berghei*, nadie ha experimentado con el sistema de *P. yoelii* para intentar utilizarlo como modelo para desarrollar una vacuna de esporozoitos completos atenuados. La inmunización con esporozoitos irradiados en el sistema de paludismo en roedores de *P. yoelii* ha sido utilizado por los científicos con los mismos objetivos descritos en 1980 por Nussenzweig [22]; es decir, para identificar los mecanismos inmunitarios de la inmunidad protectora y las dianas antigénicas de dichas respuestas inmunitarias protectoras presentes en el parásito. Por esta razón, dado que durante más de 25 años se ha “sabido” que únicamente la administración intravenosa o mediante picadura de mosquito de esporozoitos proporciona la inmunidad protectora del 100% que hace que el modelo de esporozoitos irradiados sea tan eficaz, éstas han sido las vías de administración utilizadas por los científicos que han trabajado en este sistema. Las otras vías (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intradérmica y otras) que serían necesarias para hacer que los esporozoitos irradiados fueran clínicamente prácticos y aceptables no se han utilizado.

Se ha descubierto un método para inmunizar individuos frente al paludismo que permite la vacunación de un gran número de sujetos con esporozoitos atenuados en un periodo relativamente breve, evita la impracticabilidad y el peligro potencial de los métodos anteriores mediante picadura de mosquitos infectados o, en el caso de los ratones, mediante inyección intravenosa, y proporciona una protección comparable a la alcanzada por dichos métodos anteriores.

Más particularmente, se ha descubierto que se puede alcanzar una protección eficaz contra el paludismo mediante la administración parenteral de una dosis de esporozoitos atenuados a un sujeto por una vía distinta de la inyección intravenosa, incluidas, aunque sin limitarse a las mismas, las vías subcutánea, intramuscular, intradérmica, mucosa, submucosa, epidérmica y cutánea.

Descripción detallada de la invención

La presente invención da a conocer un nuevo método clínicamente significativo y aceptable de administración de esporozoitos atenuados de la especie *Plasmodium* que hace que sea práctico utilizar esporozoitos atenuados como vacuna para prevenir el paludismo en humanos, mamíferos, aves y otras especies significativas.

La mejora significativa de la presente invención con respecto a los métodos de administración estándares anteriores de esporozoitos atenuados (administración por inyección intravenosa o mediante la picadura de mosquitos infectados) consiste en que hace posible un método clínicamente práctico y seguro de administración de una vacuna que proporciona una protección comparable a dichos métodos estándar anteriores. La administración mediante la picadura de mosquitos infectados no se puede utilizar nunca como vacuna por razones evidentes, y la administración mediante inyección intravenosa es un método que no es de uso general en vacunas, ya que se trata de un modo de administración técnicamente difícil, especialmente en los niños pequeños, y es potencialmente peligroso debido a la inyección directa en el flujo sanguíneo.

Con la presente invención, la administración parenteral se puede llevar a cabo en la piel (vías transcutánea, epidérmica, intradérmica), el tejido subcutáneo (vía subcutánea), el músculo (vía intramuscular), a través de las membranas mucosas o en el tejido submucoso. Preferentemente, la administración es por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular.

El objetivo de la atenuación consiste en debilitar los parásitos de tal modo que son lo suficientemente viables para invadir las células huésped y producir nuevas proteínas, pero son incapaces de producir la fase sanguínea de replicación asexual que causa la enfermedad. La atenuación se puede llevar a cabo de muchas maneras. Por ejemplo, atenuando los parásitos de tal modo que los esporozoitos inoculados pueden invadir las células huésped, desarrollarse parcialmente en las mismas y detener su desarrollo antes de llegar a la fase comparable a un parásito en fase hepática madura, que puede romperse, liberando merozoitos que invaden los eritrocitos y causan la enfermedad. Los parásitos atenuados de este tipo se pueden denominar parásitos metabólicamente activos no replicantes. La atenuación también se puede llevar a cabo mediante la producción de parásitos que pueden invadir las células huésped, desarrollarse normalmente en las mismas hasta una fase comparable a un parásito en fase hepática madura y romper las células huésped, pero son incapaces de desarrollarse en los eritrocitos hasta el punto necesario para causar la enfermedad. También se puede llevar a cabo atenuando los parásitos de tal modo que pueden invadir las células huésped, desarrollarse normalmente en las mismas hasta una fase comparable a un parásito en fase hepática madura y romper las células huésped, pero son incapaces de desarrollarse en los eritrocitos hasta el punto necesario para causar la enfermedad. También se puede llevar a cabo atenuando los parásitos de tal modo que los esporozoitos se desarrollan parcialmente y producen nuevas proteínas, pero detienen su desarrollo antes de llegar a la fase comparable a un parásito en fase hepática madura, que puede romperse liberando merozoitos que invaden los eritrocitos y causan la enfermedad.

Aunque se pueden utilizar numerosos métodos de atenuación, se ha descubierto que actualmente la atenuación por irradiación resulta preferente para producir un parásito metabólicamente activo no replicante. La atenuación de los esporozoitos se puede alcanzar de múltiples maneras y con múltiples pautas de dosificación. La atenuación se puede alcanzar mientras los esporozoitos se encuentran todavía en el mosquito, después de haberse aislado de los mismos y antes de operaciones tales como la crioconservación, o después de haberse aislado de los mosquitos y

después de operaciones tales como la crioconservación. La dosis actual de irradiación basada en la experiencia previa es generalmente mayor de 12.000 rads (cGy) y menor de 23.000 rads (cGy) para los esporozoitos de *Plasmodium falciparum*, siendo lo más habitual la aplicación de 15.000 rads (cGy) [34]. El experto en la materia apreciará que esta dosis puede variar de una especie a otra o de una cepa a otra, o según el equipo y las técnicas utilizadas para irradiar los esporozoitos. El experto en la materia apreciará que la irradiación se puede alcanzar mediante diversos métodos, incluidos, aunque sin limitarse a los mismos, los rayos gamma, los rayos X, los rayos ultravioleta u otras partículas subatómicas como electrones, protones, o combinaciones de estos métodos.

En el futuro, la atenuación tal como se describe en el anterior párrafo [39] quizá se pueda alcanzar mediante la manipulación genética de los parásitos antes de introducirlos en el receptor de la vacuna.

La atenuación también se puede alcanzar mediante el tratamiento de las personas, antes o después de su exposición a los esporozoitos, con fármacos que impiden el desarrollo de los parásitos para que puedan replicarse en los hepatocitos.

La atenuación también se puede alcanzar mediante el tratamiento de las personas, antes o después de su exposición a los esporozoitos, con fármacos que impiden el desarrollo de los parásitos para que puedan replicarse en los eritrocitos.

La atenuación también se puede alcanzar mediante el tratamiento de los esporozoitos con productos químicos que atenúan los parásitos.

El medio de administración puede ser cualquier método de inoculación que no sea por picadura de mosquito o administración por vía intravenosa, como por ejemplo, aunque sin limitarse a los mismos, la inyección con una única aguja y jeringuilla, con múltiples agujas y matrices de jeringuillas, con microagujas con de uno a cientos o miles de poros, la inyección sin aguja mediante técnicas de estallido de alta presión, y similares. Los esporozoitos atenuados también se pueden administrar mediante un parche transcutáneo o sobre un material particulado, por ejemplo bolas de oro. Si bien es posible lograr cierto nivel de protección con una sola inoculación, resulta preferente llevar a cabo una serie de dos o más inoculaciones o exposiciones.

El inoculante preferido es una cantidad de inmunización antipalúdica eficaz de esporozoitos atenuados de *P. falciparum* u otras especies de *Plasmodium*. En humanos, la dosis por inoculación puede estar comprendida entre aproximadamente 1.000 y 10.000.000, aunque estos valores pueden variar en función de la evaluación realizada por el médico o de la inmunogenicidad/potencia de las preparaciones de esporozoitos atenuados.

En el método según la presente invención se puede utilizar cualquier parásito de la especie *Plasmodium*, incluso genéticamente modificado. En una forma de realización, el parásito es *P. falciparum*. En otras formas de realización, por ejemplo, el parásito puede ser *P. vivax*, *P. ovale* o *P. malariae*. En otras formas de realización, puede ser una mezcla de estos parásitos. En otras formas de realización, puede ser *Plasmodium knowlesi*, *P. yoelii* u otros parásitos de la especie *Plasmodium*.

En una forma de realización, la presente invención da a conocer un kit farmacéutico que comprende esporozoitos atenuados en el instrumento de administración, por ejemplo una jeringuilla.

En otras formas de realización, la presente invención da a conocer un kit que incluye un recipiente, por ejemplo una ampolla, aunque sin limitarse a la misma, que contiene esporozoitos atenuados congelados, un recipiente tal como una ampolla que contiene un fluido para diluir dichos esporozoitos atenuados y los dispositivos de administración en sí, por ejemplo, una jeringuilla y una aguja.

En otras formas de realización, la presente invención da a conocer un kit que incluye un recipiente, por ejemplo una ampolla, aunque sin limitarse a la misma, que contiene esporozoitos atenuados congelados y deshidratados (liofilizados), un recipiente tal como una ampolla que contiene un fluido para diluir dichos esporozoitos atenuados y los dispositivos de administración en sí, por ejemplo, una jeringuilla y una aguja.

En otras formas de realización, la presente invención da a conocer un kit que incluye un recipiente, por ejemplo una ampolla, aunque sin limitarse a la misma, que contiene esporozoitos atenuados conservados, un recipiente tal como una ampolla que contiene un fluido para diluir dichos esporozoitos atenuados y los dispositivos de administración en sí, por ejemplo una jeringuilla y una aguja.

Además, la presente invención da a conocer la utilización de una administración parenteral de esporozoitos atenuados de la especie *Plasmodium* tal como se describe en la presente memoria en la administración de una vacuna para la prevención o la reducción de la gravedad del paludismo.

La presente invención da a conocer la protección parcial, mejorada o completa de un ser humano que no ha sido expuesto previamente a un patógeno causante del paludismo, o que ha estado expuesto al mismo pero no está totalmente protegido. La presente invención también se puede utilizar para reducir la posibilidad de desarrollar una

infección por paludismo, reducir la posibilidad de desarrollar la enfermedad una vez infectado, reducir la gravedad de la enfermedad, tal como la fiebre, una vez infectado, reducir la concentración de parásitos en la persona infectada o reducir la mortalidad por paludismo en las personas expuestas a los parásitos del paludismo. En muchos casos, incluso la protección parcial resulta beneficiosa. Por ejemplo, una estrategia de tratamiento con vacuna que conlleve cualquiera de estos beneficios en aproximadamente un 30% de la población puede tener un impacto significativo en la salud de una comunidad y de las personas que viven en la misma.

Una “vacuna” es una composición de materia que comprende una preparación que contiene un agente infeccioso o sus componentes y que se administra con el fin de estimular una respuesta inmunitaria que protege a la persona de la enfermedad causada por dicho agente. Una vacuna terapéutica (de tratamiento) se administra después de la infección y con ella se pretende reducir o detener el progreso de la enfermedad. Una vacuna preventiva (profiláctica) está indicada para prevenir la infección inicial. Los agentes utilizados en las vacunas pueden haberse destruido completamente (inactivos), estar vivos pero atenuados (debilitados) o se pueden haber fabricado artificialmente. Una vacuna puede comprender además un diluyente, un adyuvante, un vehículo o combinaciones de los mismos, tal como sabe el experto en la materia.

Una vacuna puede estar compuesta por componentes separados. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “componentes separados” se refiere a una situación en la que el término vacuna se compone en realidad de dos vacunas individuales que se administran a un sujeto por separado. En este sentido, una vacuna compuesta por componentes separados se puede considerar como un kit o un paquete que comprende componentes de vacuna independientes. Por ejemplo, en el contexto de la presente invención, un paquete puede comprender un componente de esporozoitos atenuados y un componente de vacuna de subunidad recombinante, incluidos, aunque sin limitarse a los mismos, una proteína recombinante, un virus recombinante, una bacteria recombinante, un parásito recombinante, una vacuna de ADN o una vacuna de ARN.

La dosis inmunizante “eficaz” puede estar comprendida entre 1.000 y 10 millones de esporozoitos, pero puede ser menor si se aumenta la inmunogenicidad/potencia de la vacuna. La vacuna se puede administrar en múltiples administraciones. El número “eficaz” de inoculaciones puede estar comprendido entre 1 y 6 dosis en un año, y dosis “de refuerzo” en los años siguientes.

Tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son únicamente ilustrativas y explicativas, y no son limitativas de la presente invención tal como se reivindica. Además, la presente invención no se limita a las formas de realización particulares descritas, dado que, por supuesto, las mismas pueden variar. Además, la terminología utilizada para describir las formas de realización particulares no pretende ser limitativa, ya que el alcance de la presente invención queda limitado exclusivamente por sus reivindicaciones.

Con respecto a los intervalos de valores, la presente invención incluye todos los valores intermedios sin excepción entre los límites superior e inferior del intervalo hasta por lo menos una décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, la presente invención comprende cualquier otro valor intermedio indicado. Además, la presente invención comprende también intervalos que excluyen el límite superior de dicho intervalo, el límite inferior o ambos, a menos que se excluyan explícitamente del intervalo indicado.

Salvo que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el significado comúnmente entendido por el experto en la materia a la que pertenece la presente invención. El experto en la materia comprenderá también que se pueden utilizar además métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria para poner en práctica o someter a ensayo la presente invención. Además, todas las publicaciones mencionadas en la presente memoria se incorporan como referencia.

Cabe señalar que, tal como se utilizan en la presente descripción y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un/a” y “el/la” incluyen los referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la expresión “una vacuna de esporozoito atenuado” incluye una pluralidad de dichos esporozoitos, y la expresión “el agente” incluye la referencia a uno o más agentes y equivalentes del mismo conocidos por los expertos en la materia, y así sucesivamente.

Además, todos los valores numéricos que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, % de pureza, etc., indicados en la presente descripción y en las reivindicaciones, quedan modificados por el término “aproximadamente”, a menos que se indique lo contrario. Análogamente, los parámetros numéricos indicados en la presente descripción y las reivindicaciones son aproximaciones que pueden variar en función de las propiedades deseadas para la presente invención. Por lo menos, y sin ánimo de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes en el alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe ser interpretado por lo menos a la luz del número de dígitos significativos indicados, aplicando las técnicas convencionales de redondeo. En cambio, los valores numéricos indicados en los ejemplos específicos se expresan con la mayor precisión posible. Sin embargo, todo valor numérico contiene de forma inherente ciertos errores debidos a la desviación estándar de su medición experimental.

Evidentemente, es posible introducir muchas modificaciones y variaciones en la presente invención a partir de las

indicaciones anteriores. Por lo tanto, debe entenderse que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la presente invención se puede poner en práctica de un modo distinto al específicamente descrito.

5 Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la invención. Dichos ejemplos son únicamente ilustrativos de la presente invención y dan a conocer diversas propiedades beneficiosas de algunas formas de realización de la misma. Dichos ejemplos no se deben considerar limitativos de la presente invención.

Ejemplos

10 **Ejemplo 1 Infectividad comparativa de la inyección intradérmica, intramuscular, subcutánea e intravenosa de esporozoitos**

15 Se llevó a cabo un estudio para investigar la infectividad comparativa de los esporozoitos recién disecados administrados por vía intradérmica (ID), intramuscular (IM), subcutánea (SC) o intravenosa (IV). Cabe señalar que la administración IV se considera el método más fiable para alcanzar la infección.

20 Métodos: se infectaron ratones Balb/c con esporozoitos de *Plasmodium yoelii* disecados manualmente de las glándulas salivales mediante administración ID, IM, SC o IV. El nivel de infección se determinó mediante la técnica de gota gruesa sanguínea desde el día 1 hasta el día 14 después de la administración. Los resultados se muestran en la tabla I.

Tabla I

Grupo	Nº de esp.	Nº de ratones	Nº de infectados	% de infectados
IV	100	10	10	100
ID	100	10	9	90
ID	500	10	10	100
IM	500	10	10	100
SC	500	10	10	100

25 Estos datos ponen de manifiesto que es posible infectar rutinariamente ratones Balb/c mediante la administración de esporozoitos en la piel, el músculo o el tejido subcutáneo.

30 **Ejemplo 2 Infectividad comparativa de dosis múltiples de esporozoitos administrados por vía intradérmica, intramuscular, subcutánea o intravenosa**

Se llevó a cabo un estudio para investigar la infectividad comparativa con un número de esporozoitos recién disecados menor que los utilizados en el ejemplo I.

35 Métodos: se infectaron ratones Balb/c con esporozoitos de *Plasmodium yoelii* disecados manualmente de las glándulas salivales por múltiples vías de administración (intradérmica (ID), intramuscular (IM), subcutánea (SC) o intravenosa (IV)). El nivel de infección se determinó mediante la técnica de gota gruesa sanguínea hasta el día 14 después de la infección. Los resultados se muestran en la tabla II.

Tabla II

40

Grupo	Nº de esp.	Nº de ratones	Nº de infectados	% de infectados
IV	100	10	10	100
	20	10	9	90
	4	10	3	30
ID	100	10	8	80
	20	10	3	30
	4	10	1	10
IM	100	10	7	70
	20	10	3	30
	4	10	1	1
SC	100	10	9	90
	20	10	4	40
	4	10	0	0

45 Estos datos ponen de manifiesto que la administración de pequeñas cantidades de esporozoitos de *Plasmodium yoelii* disecados manualmente de las glándulas salivales por vía ID, IM o SC produce infecciones en los ratones prácticamente con la misma eficacia que por vía IV. Dado que se propone la hipótesis de que existe una correlación/asociación directa entre la infectividad de los esporozoitos no irradiados cuando se administran por un método en particular y la capacidad de dichos esporozoitos cuando se irradian y administran por dicho método para

generar inmunidad protectora, estos datos sugieren que debería ser factible inmunizar con éxito por las vías ID, IM y SC al igual que por la vía IV estándar.

Ejemplo 3 Eficacia protectora de dosis única de esporozoitos irradiados administrados por vía intradérmica, intramuscular o intravenosa

Se llevó a cabo un estudio para investigar la protección comparativa proporcionada mediante la inmunización con una dosis única de 150.000 esporozoitos atenuados por radiación.

Método: se inoculó en ratones Balb/c una dosis única de 150.000 esporozoitos atenuados por radiación (10.000 rads/cGy) de *P. yoelii* por las vías ID, IM o IV. Los esporozoitos para la inmunización se obtuvieron por centrifugación en gradiente de densidad. Los ratones inoculados fueron provocados al cabo de 10 días mediante la inyección de 100 esporozoitos de *Plasmodium yoelii* disecados manualmente de las glándulas salivales. Las infecciones se evaluaron por gota gruesa hasta el día 14 después de la provocación. El nivel de infección se evaluó en una escala que iba de 1+ (apenas detectable) a 4+ (infección grave). El grupo de control no recibió ninguna inoculación de inmunización. Los resultados se muestran en la tabla III.

Tabla III

Grupo	Nº de ratones	Día 4 Protegidos/ provocados	Día 4 Nivel de inf.	Día 5 Protegidos/ provocados	Día 5 Nivel de inf.	Día 14 Protegidos/ provocados
Cont	8	0/8	++++	0/8	++++	0/8
IV	6	2/6	+	1/6	+	0/6
ID	6	4/6	+	2/6	+	1/6
IM	6	3/6	+	2/6	+	0/6

Estos datos demuestran que la administración de una dosis única de esporozoitos irradiados por las vías ID e IM da lugar a una respuesta inmunitaria protectora que proporciona una protección frente a la provocación con esporozoitos comparable a la observada tras la administración de una dosis única de esporozoitos irradiados por vía IV. Este descubrimiento fue predicho por la infectividad demostrada en los ejemplos 1 y 2 anteriores. En la medida en que los métodos de administración IM e ID son más fáciles de aplicar en un gran número de personas y que la misma se puede llevar a cabo con mucha mayor seguridad y facilidad que mediante la administración por vía IV, la presente invención hace posible la inmunización eficaz de poblaciones significativas con esporozoitos atenuados de un modo más fácil que el demostrado hasta el momento. De hecho, la presente invención permite vislumbrar por primera vez una vacuna práctica de esporozoitos atenuados. La administración de la dosis única de esporozoitos irradiados provocó una drástica reducción de la carga parasitaria en los ratones que se sometieron a provocación, un efecto que muchos expertos en la vacuna antipalúdica creen que puede ser potencialmente adecuado para reducir significativamente la morbilidad y la mortalidad por paludismo en los receptores. Sin embargo, dicha administración no proporcionó una protección completa contra la infección.

Ejemplo 4 Eficacia protectora de tres dosis de esporozoitos irradiados administrados por vía subcutánea o intravenosa

Se llevó a cabo un estudio para investigar la protección comparativa proporcionada mediante la inmunización con una pauta terapéutica estándar de tres dosis de esporozoitos de *Plasmodium yoelii* atenuados por radiación mediante la administración por vía ID o IV; una pauta de la que se espera que genere protección completa frente a la provocación por esporozoitos.

Método: se inoculó en ratones Balb/c una primera dosis de 50.000 esporozoitos atenuados por radiación (10.000 rads/cGy) de *Plasmodium yoelii* por las vías SC o IV. Dichos ratones recibieron dos dosis de refuerzo de 30.000 esporozoitos irradiados (un total de 110.000 esporozoitos divididos en 3 dosis). Los esporozoitos para la inmunización se obtuvieron por centrifugación en gradiente de densidad. Los ratones inoculados fueron provocados 14 días después de la última dosis de refuerzo con 100 esporozoitos de *Plasmodium yoelii* disecados manualmente de las glándulas salivales. Las infecciones se evaluaron por gota gruesa hasta el día 14 después de la provocación. La infección se evaluó como presente o ausente. Los resultados se muestran en la tabla IV.

Tabla IV

Grupo	Nº de ratones	Día 14 Prot./prov.	Día 14 % protegidos
Control	8	0/8	0
IV	7	7/7	100%
SC	8	8/8	100%

Los datos de la tabla IV demuestran claramente que se puede alcanzar el 100% de protección contra la infección

mediante la administración subcutánea (SC) de esporozoitos. Estos resultados fueron predichos por los resultados de los estudios indicados en el ejemplo 1, el ejemplo 2 y el ejemplo 3, pero han quedado demostrados por primera vez en este experimento. Teniendo en cuenta la comparabilidad de la infectividad a través de las vías SC, ID e IM (ejemplo 2), parece evidente que la administración de esporozoitos por dichas vías proporcionaría una protección similar. La protección del 100% documentada en el ejemplo 4 ofrece un marcado contraste con la protección del 0% alcanzada mediante la inmunización subcutánea de ratones A/J con esporozoitos atenuados por radiación de *P. berghei* documentada anteriormente [21]. Tal como se ha afirmado anteriormente, se cree que su descubrimiento fue posible gracias a su reconocimiento de que el modelo de *P. yoelii*-Balb/c es más significativo para el *P. falciparum* en los seres humanos que el sistema modelo de *P. berghei*-A/J en ratones.

Ejemplo 5 Infectividad de esporozoitos aislados por centrifugación en gradiente de densidad comparada con la disección manual de las glándulas salivales cuando se administran por vía intravenosa

En los ejemplos 3 y 4, los ratones se inmunizaron mediante la administración de esporozoitos irradiados que se habían aislado por centrifugación en gradiente de densidad. Se había asumido la hipótesis de que los esporozoitos aislados por centrifugación en gradiente de densidad de la cabeza y el tórax de los mosquitos son menos infecciosos que los esporozoitos disecados manualmente de las glándulas salivales. Si esto es efectivamente cierto y existe una asociación directa entre la infectividad de los esporozoitos y su capacidad para provocar inmunidad protectora tal como se ha indicado anteriormente (párrafo [068]), entonces deberían ser necesarios muchos menos esporozoitos disecados manualmente de las glándulas salivales que esporozoitos aislados por centrifugación en gradiente de densidad para alcanzar la inmunidad protectora. En consecuencia, se llevó a cabo en primer lugar un experimento con el fin de comparar la infectividad de los esporozoitos de *P. yoelii* aislados por centrifugación en gradiente de densidad con la de los aislados por disección manual de las glándulas salivales.

Método: se aislaron esporozoitos de *P. yoelii* de mosquitos *Anopheles stephensi* por centrifugación en gradiente de densidad o por disección manual de las glándulas salivales. Se inocularon en ratones Balb/c por vía intravenosa diferentes números de esporozoitos. Las infecciones se evaluaron por gota gruesa hasta el día 14 después de la provocación. La infección se evaluó como presente o ausente. Los resultados se muestran en la tabla V.

Tabla V

Esporozoitos aislados por disección manual o centrifugación en gradiente de densidad

<u>Nº de esp. inyectados</u>	<u>Número de infectados/Número de provocados</u>	
	<u>Disección manual</u>	<u>Centrifugación en gradiente de densidad</u>
625	10/10	7/10
125	10/10	4/10
25	10/10	0/10
5	5/10	0/10
1	0/9	0/10
<u>Dosis infecciosa 50% (ID 50)</u>	4,9	433

Los datos de la tabla V demuestran claramente que los esporozoitos disecados manualmente de las glándulas salivales son más infecciosos que los esporozoitos aislados por centrifugación en gradiente de densidad. La dosis infecciosa 50% es más de 80 veces mayor para los esporozoitos aislados por centrifugación en gradiente de densidad. Si es correcta la hipótesis de que la eficacia protectora de un lote de esporozoitos atenuados está directamente asociada con la infectividad de dicho lote de esporozoitos antes de ser atenuados, dichos datos indicarían que el número de esporozoitos atenuados necesarios para alcanzar protección debería ser significativamente menor para esporozoitos aislados mediante disección manual de las glándulas salivales que para esporozoitos aislados por centrifugación en gradiente de densidad, que ha sido el método estándar de aislamiento de los esporozoitos para los estudios de inmunización realizados en el sistema modelo de *P. yoelii*-Balb/c.

Ejemplo 6 Eficacia protectora de los esporozoitos aislados por centrifugación en gradiente de densidad en comparación con la disección manual cuando se administran por vía intravenosa

Se diseñó un experimento de eficacia protectora basado en los resultados del experimento de infectividad del ejemplo 5. Se comparó la eficacia protectora de una pauta terapéutica de esporozoitos irradiados aislados por centrifugación en gradiente de densidad que, por la experiencia anterior, se sabía que daba lugar a una protección del 90%, con la capacidad de dosis mucho menores de esporozoitos irradiados aislados por disección manual de las glándulas salivales a fin de alcanzar una inmunidad protectora.

Método: Se irradiaron mosquitos *Anopheles stephensi* infectados con esporozoitos de *P. yoelii* con 10.000 rad/cGy. Los esporozoitos se aislaron por centrifugación en gradiente de densidad o mediante disección manual de las glándulas salivales. Se inocularon por vía intravenosa en ratones Balb/c tres dosis de esporozoitos de *P. yoelii* irradiados en intervalos de 2 semanas. El grupo 1 recibió esporozoitos irradiados aislados por centrifugación en gradiente de densidad (24.000, 8.000 y 8.000 para la primera, segunda y tercera dosis, respectivamente). Los

5 grupos 2-5 recibieron esporozoitos aislados por disección manual de las glándulas salivales. El grupo 6 no recibió ninguna inmunización. Los ratones de los grupos 1-6 se sometieron a provocación con 100 esporozoitos de *P. yoelii* aislados por disección manual de las glándulas salivales 14 días después de la tercera dosis inmunizante. Las infecciones se evaluaron por gota gruesa hasta el día 14 después de la provocación. La infección se evaluó como presente o ausente. Los resultados se muestran en la tabla VI.

Tabla VI

Grupo	Nº de ratones	Nº de infectados	% protegidos
Centrifugación en gradiente de densidad 24.000, 8.000, 8.000 (1)	9	1	88,8%
Disección manual 18.000, 6.000, 6.000 (2)	10	0	100%
Disección manual 9.000, 3.000, 3.000 (3)	10	0	100%
Disección manual 4.500, 4.500, 4.500 (4)	10	0	100%
Disección manual 4.500, 1.500, 1.500 (5)	10	0	100%
Ratones no inmunizados de control (6)	10	10	0

10 Los datos presentados en la tabla VI ponen de manifiesto que los ratones inmunizados con un total de 40.000 esporozoitos irradiados de *P. yoelii* (24.000, 8.000, 8.000) aislados por centrifugación en gradiente de densidad presentaban una protección del 90%. Los ratones inmunizados con un total de 7.500 esporozoitos irradiados (4.500, 1.500, 1.500) aislados por disección manual de las glándulas salivales presentaban una protección del 100%. Estos datos, considerados junto con los datos del ejemplo 5, indican que existe una asociación directa entre la infectividad de una preparación de esporozoitos y la eficacia protectora que la misma puede generar. De hecho, todavía no está claro hasta qué punto se puede disminuir la dosis de esporozoitos irradiados disecados manualmente manteniendo una eficacia protectora del 90%-100%. Estos datos indican que la inmunización con pequeñas dosis de esporozoitos irradiados, ya sea por vía IV, ID, IM o SC, conduce a una eficacia protectora.

20 Estos datos también apoyan la hipótesis de que el sistema modelo de *P. yoelii*-Balb/c predice lo que ocurre en los seres humanos con *P. falciparum* con mayor precisión que el sistema modelo de *P. berghei*-A/J en ratones, en parte debido a la infectividad mucho mayor de los esporozoitos del sistema de *P. yoelii*. Los seres humanos se pueden inmunizar completamente mediante la picadura de 1.000 mosquitos infectados de *P. falciparum* irradiados [34]. Se cree que cada mosquito inocula no más de 10 esporozoitos cuando produce la picadura [51]. Si es efectivamente así, los seres humanos completamente inmunizados y protegidos probablemente se inoculan únicamente con 10.000 esporozoitos [50]. En cambio, en el sistema modelo de *P. berghei*-A/J en ratones se utilizaron más de 100.000 esporozoitos aislados de glándulas salivales disecadas manualmente para alcanzar protección mediante la administración por vía intravenosa, y dicha dosis inmunizante no proporcionó ninguna protección cuando se administró por vía subcutánea [21]. En el ejemplo 6, se pone de manifiesto que la administración a ratones Balb/c de 7.500 esporozoitos de *P. yoelii* aislados por disección manual de las glándulas salivales proporcionaron una protección del 100%. Que los ratones Balb/c inmunizados con esporozoitos atenuados de *P. yoelii* y los humanos inmunizados con esporozoitos atenuados de *P. falciparum* están protegidos tras la exposición a un número similar de esporozoitos atenuados, y de que los ratones A/J inmunizados con esporozoitos de *P. berghei* se inmunicen con una cantidad de esporozoitos más de 10 veces mayor apoya la hipótesis propuesta en el contexto de la presente invención según la cual el modelo de *P. yoelii*-Balb/c predice mejor lo que ocurre en los seres humanos que el sistema modelo de *P. berghei*-A/J.

Conclusiones

40 El proceso de desarrollo de una vacuna eficaz y duradera frente a infecciones de parásitos como el *P. falciparum* ha resultado ser más lento, difícil y complejo de lo esperado. No existe ninguna vacuna antipalúdica con licencia, pero se sabe que la inmunización con esporozoitos de *P. falciparum* atenuados por radiación mediante la picadura de más de 1.000 mosquitos infectados proporciona inmunidad protectora estéril en más del 90% de los individuos inmunizados durante por lo menos 10,5 meses frente a múltiples aislados de *P. falciparum* en todo el mundo. Uno de los principales obstáculos para trasladar esta pauta de inmunización a una vacuna para humanos ha sido que no es posible proporcionar una vacuna regulada a un gran número de personas mediante la picadura de mosquitos infectados. Además, el trabajo de algunos científicos indicó que únicamente se podía alcanzar una protección excelente en el sistema modelo de ratones mediante la administración intravenosa de esporozoitos atenuados, un método de administración que generalmente no se utiliza para la vacunación porque resulta técnicamente difícil y potencialmente más peligroso que los métodos estándar de administración. Dado que los métodos de administración utilizados convencionalmente en los seres humanos para la inmunización, tales como la inoculación subcutánea o intramuscular, no dieron lugar a una inmunidad protectora adecuada en este sistema modelo de ratón, hasta el momento no se había considerado posible desarrollar una vacuna de esporozoitos atenuados para humanos. Utilizando un sistema modelo diferente al utilizado por los investigadores anteriores, se ha descubierto un método de administración de esporozoitos que produce una protección de nivel elevado y resulta práctico, seguro y aceptado. Este descubrimiento debería facilitar la utilización de este método de administración de esporozoitos atenuados para desarrollar y dar a conocer una vacuna antipalúdica de esporozoitos atenuados que resulte práctica para su administración masiva.

En la presente memoria se citan las siguientes publicaciones, así como todas las mencionadas en cualquier otro lugar de la presente solicitud:

- 5 1. Breman JG. Ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the paludismo burden. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 64:1-11.
2. Gallup JL, Sachs JD. The economic burden of paludismo. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 64:85-96.
- 10 3. World Tourism Organization. International tourist arrivals by (sub)region. Junio de 2002; http://www.world-tourism.org/market_research/facts&figures/latest_data/tita01_07-02.pdf.
4. Beadle, C. y Hoffman, S. L. History of paludismo in the United States Naval Forces at war: World War I through the Vietnam conflict. *Clin. Infect. Dis.* 16:320-329, 1993.
- 15 5. Richie TL, Saul A. Progress and challenges for paludismo vaccines. *Nature* 415(6872):694-701, 2000.
6. Long CA, Hoffman SL. Parasitology: Malaria--from infants to genomics to vaccines. *Science* 297: 345-7, 2002.
- 20 7. Stoute JA, Kester KE, Krzych U, Welde BT, Hall T, White K, Glenn G, Ockenhouse CF, Garcon N, Schwenk R, Lanar DE, Sun P, Momin P, Wirtz RA, Golenda C, Slaoui M, Wortmann G, Holland C, Dowler M, Cohen J, Ballou WR. Long-term efficacy and immune responses following immunization with the RTS,S paludismo vaccine. *J Infect Dis* 178: 1139-44, 1998.
- 25 8. Kester KE, McKinney DA, Tornieporth N, Ockenhouse CF, Heppner DG, Hall T, Krzych U, Delchambre M, Voss G, Dowler MG, Palensky J, Wittes J, Cohen J, Ballou WR. Efficacy of recombinant circumsporozoite protein vaccine regimens against experimental *Plasmodium falciparum* paludismo. *J Infect Dis* 183: 640-7, 2001.
- 30 9. Bojang KA, Milligan PJ, Pinder M, Vigneron L, Allouche A, Kester KE, Ballou WR, Conway DJ, Reece WH. Efficacy of RTS,S/AS02 paludismo vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial. *Lancet.* 8 de diciembre de 2001;358(9297):1927-34.
10. Dame JB, Williams JL, McCutchan TF, Weber JL, Wirtz RA, Hockmeyer WT, Maloy WL, Haynes JD, Schneider I, Roberts D, Sanders GS, Reddy EP, Diggs CL, Miller LH. Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human paludismo parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 225: 593-9, 1984.
- 35 11. Nussenzweig RS, Vanderberg J, Most H, Orton C. Protective immunity produced by the injection of X-Irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature* 216: 160-2, 1967.
- 40 12. Clyde DF, Most H, McCarthy VC, Vanderberg JP. Immunization of man against sporozoite-induced falciparum paludismo. *Am J Med Sci* 266: 169-77, 1973.
13. Clyde DF, McCarthy VC, Miller RM, Hornick RB. Specificity of protection of man immunized against sporozoite-induced falciparum paludismo. *Am J Med Sci* 266: 398-401, 1973.
- 45 14. Rieckmann KH, Carson PE, Beaudoin RL, Cassells JS, Sell KW. Sporozoite induced immunity in man against an Ethiopian strain of *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 68: 258-9, 1974.
- 50 15. Clyde DF, McCarthy VC, Miller RM, Woodward WE. Immunization of man against falciparum and vivax paludismo by use of attenuated sporozoites. *Am J Trop Med Hyg* 24: 397-401, 1975.
16. McCarthy VC, Clyde DF. *Plasmodium vivax*: correlation of circumsporozoite precipitation (CSP) reaction with sporozoite-induced protective immunity in man. *Exp Parasitol* 41: 167-71, 1977.
- 55 17. Rieckmann KH, Beaudoin RL, Cassells JS, Sell DW. Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against falciparum paludismo. *Bull World Health Organ* 57: 261-5, 1979.
18. Clyde DF. Immunity to falciparum and vivax paludismo induced by Irradiated sporozoites: a review of the University of Maryland studies, 1971-75. *Bull World Health Organ* 68: 9-12, 1990.
- 60 19. Rieckmann KH. Human immunization with attenuated sporozoites. *Bull World Health Organ* 68: 13-6, 1990.
20. Spitalny GL, Nussenzweig RS. Effect of various routes of immunization and methods of parasite attenuation on the development of protection against sporozoite-induced rodent paludismo. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington.* 39 (Special Issue): 506-514, 1972.
- 65

21. Kramer LD, Vanderberg JP. Intramuscular immunization of mice with irradiated *Plasmodium berghei* sporozoites: Enhancement of protection with albumin. *Am J Trop Med Hyg.* 24 (6): 913-916, 1975.
- 5 22. Nussenzweig R. Use of radiation-attenuated sporozoites in the immunoprophylaxis of paludismo. *International Journal of Nuclear Medicine and Biology* 7:89-96, 1980.
23. Trager W, Jensen JB. Culture of human paludismo parasites *Plasmodium falciparum*. *Science* 193(4254): 673-5, 1976.
- 10 24. Haynes JD, Diggs CL, Hines FA, Desjardins RE. Human paludismo parasites in continuous culture. *Nature* 263 (5580):767-9, 1976.
- 15 25. Campbell CC, Collins WE, Nguyen-Dinh P, Barber A, Broderson JR. *Plasmodium falciparum* gametocytes from culture in vitro develop to sporozoites that are infectious to primates. *Science* 217(4564):1048-50, 1982.
- 20 26. Chulay JD, Schneider I, Cosgriff TM, Hoffman SL, Ballou WR, Ouakyl IA, Carter R, Trosper JH, Hockmeyer WT. Malaria transmitted to humans by mosquitoes infected from cultured *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg.* Enero de 1986; 35(1):66-8.
27. Yoshida N, Nussenzweig RS, Potocnjak P, Nussenzweig V, Aikawa M. Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of paludismo parasite. *Science* 207(4426):71-3, 1980.
28. Hilleman MR. Yeast recombinant hepatitis B vaccine. *Infection* 15(1):3-7, 1987.
- 25 29. Ballou WR, Hoffman SL, Sherwood JA, Hollingdale MR, Neva FA, Hockmeyer WT, Gordon DM. Safety and efficacy of a recombinant DNA *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. *Lancet* 1(8545):1277-81, 1987.
- 30 30. Herrington DA, Clyde DF, Losonsky G, Cortesia M, Murphy JR, Davis J, Bager S, Felix AM. Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide paludismo vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Nature* 328 (6127):257-9, 1987.
- 35 31. Nussenzweig V, Nussenzweig RS. Rationale for the development of an engineered sporozoite paludismo vaccine. *Adv Immunol* 45: 283-334, 1989.
32. Hoffman SL, Franke ED, Hollingdale MR, Druilhe P. Attacking the infected hepatocyte. In: Hoffman SL, ed. *Malaria Vaccine Development: A Multi-Immune Response Approach*. Washington, D.C.: ASM Press, págs. 35-75, 1996.
- 40 33. Hoffman SL, Miller LH. Perspectives on paludismo vaccine development. In: Hoffman SL, ed. *Malaria Vaccine Development: a Multi-Immune Response Approach*. Washington, D.C.: ASM Press, págs. 1-13, 1996.
- 45 34. Hoffman SL, Goh LM, Luke TC, Schneider I, Le TP, Doolan DL, Sacci J, de la Vega P, Dowler M, Paul C, Gordon DM, Stoute JA, Church LW, Sedegah M, Heppner DG, Ballou WR, Richie TL. Protection of humans against paludismo by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Infect Dis* 185: 1155-64, 2002.
- 50 35. Egan JE, Hoffman SL, Haynes JD, Sadoff JC, Schneider I, Grau GE, Hollingdale MR, Ballou WR, Gordon DM. Humoral immune responses in volunteers immunized with Irradiated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Am J Trop Med Hyg* 49: 166-73, 1993.
36. Malik A, Egan JE, Houghten RA, SadoffJC, Hoffman SL. Human cytotoxic T lymphocytes againstthe *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3300-4, 1991.
- 55 37. Wize B, Houghten RA, Parker K, Coligan JE, Church P, Gordon DM, Ballou WR, Hoffman SL. Irradiated sporozoite vaccine induces HLA-B8-restricted cytotoxic T lymphocyte responses against two overlapping epitopes of the *Plasmodium falciparum* surface sporozoite protein 2. *J Exp Med* 182: 1435-45, 1995.
- 60 38. Wize B, Houghten R, Church P, Tine JA, Lanar DE, Gordon DM, Ballou WR, Sette A, Hoffman SL. HLA-A2restricted cytotoxicT lymphocyte responses to multiple *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2 epitopes in sporozoite-immunized volunteers. *J Immunol* 155: 766-75, 1995.
- 65 39. Krzych U, Lyon JA, JareedT, Schneider I, Hollingdale MR, Gordon DM, Ballou WR. T lymphocytes from volunteers immunized with Irradiated *Plasmodium falciparum* sporozoites recognize liver and blood stage paludismo antigens. *J Immuno/* 155: 4072-7, 1995.

40. Doolan DL, Hoffman SL, Southwood S, Wentworth PA, Sidney J, Chestnut RW, Keogh E, Apella E, Nutman TB, Lal AA, Gordon DM, Oloo A, Sette A. Degenerate cytotoxic T cell epitopes from *P. falciparum* restricted by H LAA and HLA-B supertypes alleles. *Immunity* 7: 97-112, 1997.
- 5 41. Doolan DL, Southwood S, Chesnut R, Appella E, Gomez E, Richards A, Higashimoto YI, Maewal A, Sidney J, Gramzinski RA, Mason C, Koech D, Hoffman SL, Sette A. HLA-DR-promiscuous T cell epitopes from *Plasmodium falciparum* pre- erythrocytic-stage antigens restricted by multiple HLA class II alleles. *J Immunol* 165: 1123-37, 2000.
- 10 42. Herrington D, Davis J, Nardin E, Beier M, Cortese J, Eddy H, Losonsky G, Hollingdale M, Sztein M, Levine M, Nussenzweig RS, Clyde D, Edelman R. Successful immunization of humans with Irradiated sporozoites: humoral and cellular responses of the protected individuals. *Am J Trop Med Hyg* 45: 539-47, 1991.
- 15 43. Edelman R, Hoffman SL, Davis JR, Beier M, Sztein MB, Losonsky G, Herrington DA, Eddy HA, Hollingdale MR, Gordon DM, Clyde DF. Long-term persistence of sterile immunity in a volunteer immunized with X-Irradiated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Infect Dis* 168: 1066-70, 1993.
- 20 44. Nardin EH, Herrington DA, Davis J, Levine M, Stuber D, Takacs B, Caspers P, Barr P, Altszuler R, Clavijo P, Nussenzweig RS. Conserved repetitive epitope recognized by CD4+ clones from a paludismo-immunized volunteer. *Science* 246: 1603-6, 1989.
- 25 45. Nardin EH. T cell responses in a sporozoite-immunized human volunteer and a chimpanzee. *Immunol Lett* 25: 43-8, 1990.
- 30 46. Nardin EH, Nussenzweig RS, Altszuler R, Herrington D, Levine M, Murphy J, Davis J, Bathurst I, Barr P, Romero P, Zavala F. Cellular and humoral immune responses to a recombinant *P. falciparum* CS protein in sporozoite-immunized rodents and human volunteers. *Bull World Health Organ* 68: 85-7, 1990.
- 35 47. Moreno A, Clavijo P, Edelman R, Davis J, Sztein M, Herrington D, Nardin E. Cytotoxic CD4+ T cells from a sporozoite-immunized volunteer recognize the *Plasmodium falciparum* CS protein. *Int Immunol* 3: 997-1003, 1991.
- 40 48. Moreno A, Clavijo P, Edelman R, Davis J, Sztein M, Sinigaglia F, Nardin E. CD4+ T cell clones obtained from *Plasmodium falciparum* sporozoite-immunized volunteers recognize polymorphic sequences of the circumsporozoite protein. *J Immunol* 151: 489-99 1993.
49. Butler D. Mosquito production mooted as fast track to paludismo vaccine. *Nature* 435-437,2003.
50. Luke TC, Hoffman SL. Rationale and Plans for Developing a Non-Replicating, Metabolically Active Radiation Attenuated *Plasmodium falciparum* Sporozoite Vaccine. *Journal of Experimental Biology* 206:3803-3808, 2003.
51. Beier, JC., y otros, Quantitation of *Plasmodium falciparum* sporozoites transmitted in vitro by experimentally infected *Anopheles gambiae* and *Anopheles stephensi*. *Am J Trop Med Hyg* 44(5): 564-70, 1991.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Vacuna que comprende una especie aislada, metabólicamente activa, atenuada, del parásito esporozoítico de *Plasmodium*, siendo dicha especie seleccionada de entre el grupo constituido por *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*, y un vehículo, para su utilización en la estimulación de una respuesta inmunitaria y en el conferimiento de inmunidad protectora en huéspedes humanos mediante administración parenteral no intravenosa.
- 10 2. Vacuna según la reivindicación 1, en la que dichos parásitos esporozoíticos se obtienen a partir de glándulas salivales del mosquito *Anopheles* disecadas manualmente.
- 15 3. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende esporozoitos de *Plasmodium falciparum* y por lo menos una especie adicional de esporozoitos de *Plasmodium*.
- 20 4. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dichos parásitos esporozoíticos pueden invadir las células de dicho huésped.
- 25 5. Vacuna según la reivindicación 4, en la que dichas células comprenden células hepáticas, dichos parásitos esporozoíticos inducen la ruptura de las células hepáticas y dichos parásitos esporozoíticos no pueden experimentar un desarrollo posterior en el interior de los eritrocitos huésped.
- 30 6. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la atenuación se alcanza a través de unos medios de alteración génica.
- 35 7. Vacuna según la reivindicación 6, en la que dichos medios se seleccionan de entre el grupo constituido por irradiación, manipulación genética y tratamiento de esporozoitos con productos químicos.
- 40 8. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende esporozoitos de *Plasmodium* atenuados por radiación.
- 45 9. Vacuna según la reivindicación 8, en la que la dosis de radiación atenuante es de por lo menos 12.000 cGy y no mayor de 23.000 cGy.
- 50 10. Vacuna según la reivindicación 9, en la que la dosis de radiación atenuante es de aproximadamente 15.000 cGy.
- 55 11. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende por lo menos 1.000 esporozoitos, pero no más de 10.000.000 esporozoitos.
- 60 12. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, útil para su administración a huéspedes humanos con el fin de prevenir la enfermedad específica de paludismo en dichos huéspedes tras la introducción posterior en dichos huéspedes de esporozoitos infecciosos de *Plasmodium*.
- 65 13. Vacuna según la reivindicación 1, en la que dicha inmunidad protectora resulta suficiente para prevenir el paludismo en sustancialmente la totalidad de dichos huéspedes tras la provocación posterior con un parásito de *Plasmodium*.
14. Kit farmacéutico de vacunación para estimular una respuesta inmunitaria y conferir inmunidad protectora a huéspedes humanos frente a uno o más patógenos causantes del paludismo, comprendiendo dicho kit una vacuna de parásitos esporozoíticos de *Plasmodium* aislados, metabólicamente activos, atenuados, según las reivindicaciones 1 a 13, un vehículo y unos medios para su administración parenteral no intravenosa.
15. Kit de vacunación según la reivindicación 14, en el que dichos medios son una aguja.
16. Kit de vacunación según la reivindicación 14, en el que dichos medios son una matriz de microagujas.
17. Kit de vacunación según la reivindicación 14, en el que dichos medios son un inyector balístico sin aguja.
18. Kit de vacunación según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en el que dicha vacuna resulta útil para su administración a huéspedes humanos con el fin de prevenir la enfermedad específica de paludismo en dichos huéspedes, tras la introducción posterior en dichos huéspedes de esporozoitos infecciosos de *Plasmodium*.
19. Kit de vacunación según la reivindicación 14, en el que dicha inmunidad protectora resulta suficiente para prevenir el paludismo en sustancialmente la totalidad de dichos huéspedes tras la provocación posterior con un parásito de *Plasmodium*.
20. Composición que comprende parásitos esporozoíticos de *Plasmodium* aislados, metabólicamente activos, atenuados, según las reivindicaciones 1 a 13, para su utilización en la obtención de una respuesta inmunitaria y el

conferimiento de inmunidad protectora en huéspedes humanos frente a uno o más patógenos causantes del paludismo mediante la administración parenteral no intravenosa por lo menos de una dosis de vacuna.

5 21. Composición según la reivindicación 20, formulada para la administración posterior a dichos huéspedes de una o más dosis de refuerzo de vacuna.

10 22. Composición según la reivindicación 20 ó 21, en la que la dosis de vacuna comprende un componente de subunidad específico de *Plasmodium* seleccionado de entre el grupo constituido por proteína nativa, proteína recombinante, virus recombinante, bacteria recombinante, parásito recombinante, ADN y ARN.

23. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en la que dicha respuesta inmunitaria es terapéutica para un huésped infectado con esporozoitos de la especie *Plasmodium*.

15 24. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, en la que dicha composición se formula para atenuar la enfermedad específica de paludismo en dichos huéspedes, resultando dicha enfermedad de la introducción en dichos huéspedes de esporozoitos infecciosos de *Plasmodium* posterior a dicha administración de dicha dosis de vacuna.

20 25. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, en la que dicha composición previene la enfermedad específica de paludismo en dichos huéspedes, tras la introducción en dichos huéspedes de esporozoitos infecciosos de *Plasmodium* con posterioridad a dicha administración de dicha dosis de vacuna.

25 26. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25, en la que dicha administración es una inoculación en tejido huésped seleccionada de entre un grupo constituido por administración subcutánea, dérmica, muscular, epidérmica, mucosa, submucosa y cutánea.

30 27. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 26, en la que dichos parásitos esporozoítos son aislados además de una sola especie seleccionada de entre el grupo constituido por *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi* y *Plasmodium malariae*.

28. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 26, en la que dichos parásitos esporozoítos son aislados además de por lo menos dos especies seleccionadas de entre el grupo constituido por *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi* y *Plasmodium malariae*.

35 29. Composición según la reivindicación 20, en la que dichos esporozoitos son irradiados mientras se encuentran dentro de los mosquitos.

40 30. Composición según la reivindicación 21, en la que dichas una o más dosis de refuerzo de vacuna comprenden por lo menos 1.000 esporozoitos, pero no más de 10.000.000 esporozoitos.