

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 175**

51 Int. Cl.:
A61K 39/015 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05808091 .2**
96 Fecha de presentación: **13.10.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1802336**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.07.2007**

54 Título: **VACUNAS DE SENSIBILIZACIÓN/REFUERZO DE MALARIA.**

30 Prioridad:
14.10.2004 US 619056 P
14.10.2004 EP 04105035

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.12.2011

73 Titular/es:
CRUCCELL HOLLAND B.V.
ARCHIMEDES WEG 4
2333 CN LEIDEN, NL
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA y
THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES

72 Inventor/es:
PAU, Maria Grazia;
GOUDSMIT, Jaap;
COHEN, Joseph D.;
DUBOIS, Patrice M.;
STEWART, V. Ann y
HEPPNER, Donald

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 371 175 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacunas de sensibilización/refuerzo de malaria

Campo de la invención

5 La invención se refiere al campo de medicina. Específicamente, la invención se refiere a estrategias de vacuna de sensibilización/refuerzo novedosas que usan vectores adenovirales producidos de forma recombinante y proteínas purificadas en el contexto de un adyuvante para la prevención de malaria falciparum.

Antecedentes de la invención

10 La malaria actualmente representa una de las infecciones más frecuentes en áreas tropicales y subtropicales en todo el mundo. Cada año, las infecciones por malaria matan hasta 2,7 millones de personas en países en desarrollo y emergentes. La frecuencia ampliamente extendida y la incidencia elevada de la malaria son una consecuencia de los números crecientes de parásitos resistentes a fármacos y vectores de parásitos resistentes a insecticidas. Otros factores incluyen cambios ambientales y climáticos, alteraciones civiles y movilidad aumentada de las poblaciones.

15 La malaria está causada por parásitos hemoprotozoarios transmitidos por mosquito que pertenecen al género *Plasmodium*. Cuatro especies de protozoarios de *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*) son responsables de la enfermedad en el ser humano; muchos otros provocan enfermedad en animales, tales como *P. yoelii* y *P. berghei*. *P. falciparum* es responsable de la mayoría de las infecciones en seres humanos y es el tipo más letal. Los parásitos de malaria tienen un ciclo de vida que consiste en cuatro etapas separadas. Cada una de estas etapas es capaz de inducir respuestas inmunes específicas dirigidas frente al parásito y los antígenos específicos de etapa que se originan de forma correspondiente, aunque la malaria inducida de forma natural no protege frente a la reinfección.

20

Los parásitos de la malaria se transmiten al ser humano por varias especies de mosquitos *Anopheles*. Los mosquitos infectados inyectan la forma de esporozoito del parásito de malaria en el torrente sanguíneo del mamífero. Los esporozoitos permanecen por pocos minutos en la circulación antes de invadir los hepatocitos. En esta etapa el parásito se localiza en el entorno extracelular y está expuesto a ataque de anticuerpos, principalmente dirigido a la proteína de circumsporozoito (CS), un componente principal de la superficie del esporozoito. Una vez que está en el hígado, el parásito se replica y desarrolla en un esquizonte. Durante esta etapa, el parásito invasor experimentará multiplicación asexual, produciendo hasta 20.000 merozoitos por célula infectada. Durante esta etapa intracelular del parásito, los agentes principales de la respuesta inmune del huésped son los linfocitos T, especialmente los linfocitos T CD8+ (Romero y col. 1989). Después de aproximadamente una semana de la infección hepática, miles de merozoitos se liberan en el torrente sanguíneo y entran a los glóbulos rojos (RBC), volviéndose dianas de respuesta inmune mediada por anticuerpo y citoquinas secretadas por células T. Después de invadir los eritrocitos, los merozoitos experimentan varias etapas de replicación, se transforman en trofozoitos y esquizontes, que se rompen para producir una nueva generación de merozoitos que posteriormente infectan nuevos RBC. La etapa eritrocítica está asociada con enfermedad clínica manifiesta. Un número más pequeño de trofozoitos se puede desarrollar en gametocitos masculinos o femeninos, que son la etapa sexual del parásito. Cuando los mosquitos susceptibles ingieren gametocitos, la fertilización de estos gametos conduce a la formación de cigotos y a la posterior transformación en oocinetos, después en oocistos y finalmente en esporozoitos, que migran a la glándula salivar para completar el ciclo.

25

30

35

Las dos ramas principales de la respuesta inmune específica de patógeno que se producen tras la entrada del parásito en el organismo son celular y humoral. El primer brazo, la respuesta celular, se refiere a células T CD8+ y CD4+ que participan en la respuesta inmune. Los linfocitos T citotóxicos (CTL) expresan CD8 y son capaces de destruir específicamente células infectadas que expresan antígenos patógenos en su superficie. Las células T CD4+ o células T auxiliares apoyan el desarrollo de CTL, producen diversas citoquinas y también ayudan a inducir a las células B a dividirse y producir anticuerpos específicos para los antígenos. Durante la respuesta humoral, las células B específicas de un antígeno particular se activan, se replican y se diferencian y producen anticuerpos específicos de antígeno.

40

45

Ambas ramas de la respuesta inmune son relevantes para la protección frente a la infección de malaria. Cuando los esporozoitos infecciosos viajan al hígado y entran a los hepatocitos, los esporozoitos se vuelven patógenos intracelulares, pasando poco tiempo fuera de la célula infectada. En esta etapa, las células T CD8+ y las células T CD4+ son especialmente importantes porque estas células T y sus productos de citoquina, tales como interferón γ (IFN- γ), contribuyen a la destrucción de hepatocitos huésped infectados. La eliminación de los parásitos hepáticos intracelulares en el modelo de malaria murino se ha observado que depende de la respuesta de células T CD8+ dirigidas frente a péptidos expresados por los parásitos en etapa hepática (Hoffman y Doolan, 2000). El agotamiento de células T CD8+ anula la protección frente a la exposición a esporozoito y la transferencia adoptiva de células T CD8+ a animales sin tratar confiere protección.

50

55

Cuando una infección de malaria alcanza la etapa eritrocítica en la que los merozoitos se replican en RBC, también se observa que los merozoitos circulan libremente en el torrente sanguíneo. Debido a que el eritrocito no expresa moléculas de CMH de Clase I o Clase II necesarias para la interacción afín con células T, se piensa que las

respuestas de anticuerpos son más relevantes en esta etapa. En conclusión, un enfoque de vacuna de malaria posible sería más beneficioso si el mismo indujera una respuesta inmune celular marcada así como también una respuesta inmune humoral marcada para hacer frente a las diferentes etapas en las que el parásito aparece en el cuerpo humano.

5 Los enfoques actuales hacia el desarrollo de vacuna de malaria se pueden clasificar de acuerdo con las diferentes etapas del desarrollo del parásito, como se ha descrito anteriormente. Se pueden distinguir tres tipos de vacunas posibles:

- 10 - Vacunas pre-eritrocíticas, que se dirigen frente a hepatocitos infectados por esporozoitos y/o esquizontes. Históricamente, este enfoque ha estado dominado por estrategias basadas en (CS). Debido a que la fase pre-eritrocítica de infección es asintomática, una vacuna pre-eritrocítica conferiría de forma ideal inmunidad estéril, mediada por respuesta inmune humoral y celular y evitaría completamente la infección por malaria latente.
- 15 - Las vacunas de etapa sanguínea asexual, que se dirigen frente a los RBC infectados o al propio merozoito, se diseñan para minimizar la gravedad clínica. Estas vacunas deberían reducir la morbilidad y la mortalidad y tienen por objeto evitar que el parásito entre y/o se desarrolle en los eritrocitos.
- Las vacunas bloqueantes de la transmisión, que se diseñan para obstaculizar el desarrollo del parásito en el huésped de mosquito. Este tipo de vacuna favorecería la reducción de los índices de infección por malaria en toda la población.

20 Finalmente, la fiabilidad del desarrollo de vacunas de malaria de combinación que se dirigen a etapas múltiples del ciclo de vida del parásito es lo que se está persiguiendo con las vacunas denominadas multicomponente y/o multietapa.

25 Actualmente no está disponible una vacuna frente a la malaria disponible en el mercado, aunque el desarrollo de vacuna frente a la malaria se inició hace más de 30 años. La inmunización de roedores, primates no humanos y seres humanos con esporozoitos atenuados por radiación confería protección frente a la exposición posterior con esporozoitos viables (Nussenzweig y col. 1967; Clyde y col. 1973). Sin embargo, hasta ahora el gasto y la carencia de un sistema de cultivo a gran escala fiable para la producción de esporozoitos irradiados han evitado la aplicación generalizada de tales vacunas (Luke y col. 2003).

30 Hasta la fecha los candidatos de vacuna más prometedores ensayados en seres humanos se han basado en un número pequeño de antígenos de superficie de esporozoitos. La proteína CS es el único antígeno de *P. falciparum* que se ha demostrado que previene de manera constante la malaria cuando se usa como la base de inmunización activa en seres humanos frente a la infección transmitida por mosquito, aunque a niveles que con frecuencia son insuficientes. El análisis teórico ha indicado que la protección de la vacuna así como la eficacia de la vacuna debe ser superior al 85 % o de otra forma pueden escapar mutantes que son más virulentos en áreas endémicas (Gandon y col. 2001).

35 Una manera de inducir una respuesta inmune en un mamífero es administrando un vector infeccioso, que porta un ácido nucleico que codifica el antígeno en su genoma. Un portador de este tipo es un adenovirus recombinante, que ha perdido la capacidad de replicación mediante la eliminación de regiones dentro del genoma que normalmente son esenciales para la replicación, tales como la región E1. Los ejemplos de adenovirus recombinante que comprenden genes que codifican antígeno se conocen en la técnica (documento WO 96/39178). Por ejemplo, los componentes antigénicos obtenidos de VIH se ha demostrado que producen una respuesta inmune si se administran mediante adenovirus recombinantes (documentos WO 01/02607; WO 02/22080; US 6.733.993). En la malaria, se han desarrollado vacunas basadas en adenovirus recombinante. Estos vectores expresan la proteína CS entera de *P. yoelii*, uno de los modelos de malaria de ratón y estos vectores se ha demostrado que son capaces de inducir inmunidad estéril en ratones en respuesta a una dosis de inmunización única (Bruña-Romero y col. 2001). Se ha demostrado que las células T CD8+ median principalmente esta protección inducida por adenovirus.

45 Ya que un porcentaje elevado de individuos tienen inmunidad preexistente frente a los vectores adenovirales usados generalmente tales como el adenovirus de serotipo 5 (Ad5), se desarrollaron nuevas tecnologías en la técnica, en las que adenovirus sin capacidad de replicación recombinantes se basaban en serotipos que encontraban inmunidad preexistente en la forma de anticuerpos neutralizantes únicamente en un porcentaje pequeño de individuos sanos. Estos serotipos generalmente se denominan serotipos neutralizados bajos o serotipos raros. Se observó que Ad11, Ad24, Ad26, Ad34, Ad35, Ad48, Ad49 y Ad50 eran particularmente útiles (documentos WO 00/70071; WO 02/40665; WO 2004/037294; WO 2004/083418; Vogels y col. 2003).

55 Una vacuna basada en ADN que contiene un plásmido que expresa la proteína CS de *P. falciparum* la desarrolló Vical, Inc. San Diego, CA, EE.UU. y Naval Medical Research Center (Horn y col. 1995). Los estudios en un modelo de ratón demostraron la inducción de CTL específicos de antígeno y respuestas de anticuerpo a continuación de inmunización con ADN de plásmido (Doolan y col. 1998). Sin embargo, hasta ahora el uso exclusivo de vacunas de ADN ha demostrado ser subóptimo para la inducción de respuestas inmunes protectoras en seres humanos. Mediante el uso de la vacuna de ADN se observó que los voluntarios vacunados no desarrollaban anticuerpos frente

a la proteína CS según se evaluó mediante ensayo de anticuerpo fluorescente indirecto (IFAT) frente a esporozoitos secados al aire y ELISA frente a péptidos recombinantes y sintéticos (Wang y col. 2001), aunque sus respuestas de CTL fueron significativas.

Por el contrario, el enfoque de la vacuna de malaria de RTS,S (proteína purificada) (Gordon y col. 1995; documentos US 6.306.625; WO 93/10152) es capaz de inducir una respuesta de anticuerpo marcada hacia la proteína CS (Kester y col. 2001; Stoute y col. 1997 y 1998), a la vez que también es un inductor potente de la inmunidad celular y humoral de tipo Th1. Más importante, esta vacuna protege de forma repetible aproximadamente a la mitad de los receptores. Sin embargo, la protección provocada por RTS,S es de duración corta (Stoute y col. 1998). La inmunización con RTS,S induce anticuerpos anti-CS y respuestas de IFN- γ dependientes de células T CD4+, pero malas respuestas de CTL dependientes de células T CD8+ o de IFN- γ (Lalvani y col. 1999). Sin embargo, estas respuestas de CD8+ mínimas que se producen se ha demostrado que se correlacionan con la protección en ensayos humanos (Sun y col. 2003). Por tanto, una mejora racional se enfocaría en la potenciación de la inducción de respuestas de células T CD8+ hacia CS inducida por RTS,S.

Stoute y col. The Journal of Infectious Disease, 1998, vol. 178, páginas 1139-44 y Garçon y col. Expert Review of Vaccines, abril 2003, vol. 2, N° 2, páginas 231-238 divulgan la eficacia del candidato RTS,S de vacuna de esporozoito de malaria con una emulsión de aceite-en-agua además de los inmunoestimulantes monofosforil lípido A y el derivado de saponina QS2.

El documento WO 2004/055187 divulga adenovirus recombinantes sin capacidad de replicación que comprenden un ácido nucleico heterólogo que codifica el antígeno de CS de *Plasmodium* para su uso como una vacuna.

El desafío de desarrollar una vacuna de malaria falciparum que tenga una eficacia protectora de al menos el 85 % aún no se ha alcanzado. La tarea es particularmente difícil debido a que, a diferencia de otras enfermedades que a menudo son fatales tales como el sarampión o la viruela, la exposición a malaria y el desarrollo de inmunidad natural no es protectora frente a la infección posterior por malaria. De todos los candidatos de vacuna y las estrategias de administración de vacuna ensayadas hasta la fecha, únicamente RTS,S ha proporcionado de manera constante algún nivel de protección. Otros candidatos ensayados han sido inadecuadamente inmunogénicos o inmunogénicos pero inadecuadamente protectores. La presente solicitud describe una combinación estratégica de formulaciones de vacuna diseñada para aprovechar la inmunogenicidad serológica óptima del enfoque de proteína/adyuvante junto con una inducción excelente de respuestas celulares proporcionadas por los vectores adenovirales sin capacidad de replicación recombinantes.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Régimenes heterólogos de vacunación de sensibilización/refuerzo, seguidos por medición de la respuesta de células T en análisis de ELISPOT de IFN- γ con relación al extremo C de CS. La respuesta se midió dos semanas después del refuerzo final. Las barras horizontales representan medias geométricas.

Figura 2. Respuesta de células T medida en análisis de ELISPOT de IFN- γ con relación al extremo C de CS. La respuesta se midió tres meses después del refuerzo final. Las barras horizontales representan medias geométricas.

Figura 3. Respuesta de anticuerpo medida en ELISA, con relación a la región de repetición de CS dos semanas después del refuerzo. Las barras horizontales representan medias geométricas.

Figura 4. Respuesta de anticuerpo medida en ELISA, con relación a la región de repetición de CS tres meses después del refuerzo. Las barras horizontales representan medias geométricas.

Figura 5. Respuesta de células T, en experimentos con sensibilización con un vector Ad35-CS recombinante y refuerzo con RTS,S o Ad35-CS, medida por ELISpot de IFN- γ después de dos semanas (izquierda) o después de tres meses (derecha). El régimen de sensibilización/refuerzo/refuerzo homólogo RTS,S/RTS,S/RTS,S se usó como una referencia.

Figura 6. Respuesta de anticuerpo, en experimentos con sensibilización con un vector Ad35-CS recombinante y refuerzo con RTS,S o Ad35-CS, medida por ELISA después de dos semanas (izquierda) o después de tres meses (derecha). El régimen de sensibilización/refuerzo/refuerzo homólogo RTS,S/RTS,S/RTS,S se usó como una referencia.

Figura 7. Respuesta de células T, en experimentos con refuerzo con un vector Ad35-CS recombinante y sensibilización con RTS,S o Ad35-CS, medida después de dos semanas (izquierda) o después de tres meses (derecha). El régimen de sensibilización/refuerzo/refuerzo homólogo RTS,S/RTS,S/RTS,S se usó como una referencia.

Figura 8. Respuesta de anticuerpo, en experimentos con refuerzo con un vector Ad35-CS recombinante y con sensibilización con RTS,S o Ad35-CS, medida después de dos semanas (izquierda) o después de tres meses (derecha). El régimen de sensibilización/refuerzo/refuerzo homólogo RTS,S/RTS,S/RTS,S se usó como una referencia.

Figura 9. Respuesta de células T medida en análisis de ELISPOT de IFN- γ con relación al extremo N de CS, dos semanas después del refuerzo. Las barras horizontales representan medias geométricas.

Figura 10. Respuesta de células T medida en análisis de ELISPOT de IFN- γ con relación al extremo N de CS, tres meses después del refuerzo. Las barras horizontales representan medias geométricas.

Figura 11. Respuesta de células T, al extremo N, en experimentos con sensibilización con un vector Ad35-CS recombinante y refuerzo con RTS,S o Ad35-CS, medida después de dos semanas (izquierda) o después de tres meses (derecha). El régimen de sensibilización/refuerzo/refuerzo homólogo RTS,S/RTS,S/RTS,S se usó como una referencia.

5 Figura 12. Respuesta de células T, al extremo N, en experimentos con refuerzo con un vector Ad35-CS recombinante y sensibilización con RTS,S o Ad35-CS, medida después de dos semanas (izquierda) o después de tres meses (derecha). El régimen de sensibilización/refuerzo/refuerzo homólogo RTS,S/RTS,S/RTS,S se usó como una referencia.

Sumario de la invención

10 La invención se refiere a un kit de partes que comprende un adenovirus recombinante sin capacidad de replicación en un excipiente adecuado, comprendiendo dicho adenovirus un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de circumsporozoito (CS) que procede de un parásito que provoca la malaria; y un antígeno proteínico potenciado con adyuvante, preferentemente también que procede de un parásito que provoca la malaria; en el que dicho adenovirus recombinante se selecciona entre el grupo que consiste en adenovirus humano de serotipo 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 y 50. Un antígeno proteínico preferido comprende RTS,S. El parásito que provoca la malaria preferido es *Plasmodium falciparum*.

15 En otra realización la invención también se refiere al uso de un adenovirus recombinante sin capacidad de replicación que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de CS que procede de un parásito que provoca la malaria y un antígeno proteínico potenciado con adyuvante, preferentemente que procede de un parásito que provoca la malaria tal como *Plasmodium falciparum*, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de malaria, en el que dicho adenovirus recombinante es un adenovirus de simio o un adenovirus humano de serotipo 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 ó 50.

20 La invención divulga determinados regímenes de sensibilización-refuerzo preferidos, en los que se prefiere que el adenovirus recombinante sin capacidad de replicación se use como una composición de sensibilización y el antígeno proteínico potenciado con adyuvante se use como una composición de refuerzo.

25 La invención también se refiere a un procedimiento para vacunar a un mamífero para una infección de malaria que comprende las etapas de aplicar una vacuna de sensibilización a dicho animal con un adenovirus recombinante sin capacidad de replicación en un excipiente adecuado, comprendiendo dicho adenovirus un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de CS que procede de un parásito que provoca la malaria; y reforzar dicho mamífero con un antígeno proteínico potenciado con adyuvante, preferentemente RTS,S.

Descripción detallada

30 La presente invención se refiere a un kit de partes que comprende un adenovirus recombinante sin capacidad de replicación en un excipiente farmacéuticamente aceptable, comprendiendo dicho adenovirus un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de circumsporozoito (CS) que procede de un parásito que provoca la malaria; y un antígeno proteínico potenciado con adyuvante; en el que dicho adenovirus recombinante se selecciona entre el grupo que consiste en adenovirus humano de serotipo 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 y 50. Preferentemente, dicho adenovirus recombinante es adenovirus humano de serotipo 35. También se prefiere un kit de acuerdo con la invención en el que dicho antígeno proteínico comprende una proteína CS o un fragmento inmunogénico de la misma, de un parásito que provoca la malaria. Dicho antígeno proteínico comprende preferentemente una proteína híbrida de proteína CS o un fragmento inmunogénico de la misma fusionada al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HbsAg), en la forma de partículas de lipoproteína con HbsAg. En una realización preferida adicional, el antígeno proteínico comprende RTS,S. También se prefiere que dicho antígeno proteínico esté potenciado con adyuvante con QS21 y 3D-MPL, preferentemente en una formulación con liposomas que contienen colesterol.

35 Aunque se conoce en la técnica que diferentes parásitos provocan malaria en seres humanos, una realización de la presente invención es un kit de partes de acuerdo con la invención, en el que dicho parásito que provoca la malaria es *Plasmodium falciparum*.

40 Para respuestas inmunes apropiadas es preferible que dicho ácido nucleico heterólogo esté optimizado con codón para aumentar la producción de la proteína codificada en un mamífero, preferentemente un ser humano. El adenovirus recombinante puede estar presente en una mezcla con un adyuvante.

45 La aplicabilidad de adenovirus de simio para su uso en terapia génica o vacunas humanas está bien valorada por los expertos en la materia. A pesar de esto, se observó que otros adenovirus no humanos tales como adenovirus canino y bovino infectaban células de humano *in vitro* y, por lo tanto, también son aplicables para uso humano ya que su seroprevalencia es baja en muestras humanas. Por tanto, la invención también se refiere a un kit de partes que comprende un adenovirus de simio, canino o bovino recombinante sin capacidad de replicación en un excipiente farmacéuticamente aceptable, comprendiendo dicho adenovirus un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de circumsporozoito (CS) optimizado con codón de *Plasmodium falciparum*; y un antígeno proteínico potenciado con adyuvante que comprende RTS,S, en el que se prefiere que dicho antígeno proteínico esté potenciado con adyuvante con QS21 y 3D-MPL, preferentemente en una formulación con liposomas que contienen

colesterol.

Se divulga por la presente invención que determinados regímenes de sensibilización-refuerzo proporcionan un resultado inesperado y sorprendente con respecto a respuestas inmunes si los diferentes componentes del kit de partes divulgados se administran en un orden determinado. Por tanto, la invención también se refiere a un kit de partes de acuerdo con la invención, en el que dicho adenovirus recombinante sin capacidad de replicación es una composición de sensibilización y dicho antígeno proteináceo potenciado con adyuvante es una composición de refuerzo. La respuesta inmune desencadenada por una administración única (sensibilización) de una vacuna con frecuencia no es suficientemente potente y/o persistente para proporcionar protección eficaz. La administración repetida (refuerzo) puede potenciar significativamente las respuestas humoral y celular hacia antígenos de vacuna (por ejemplo, véase Estcourt y col. 2002).

La invención también se refiere al uso de un adenovirus recombinante sin capacidad de replicación que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de CS que procede de un parásito que provoca la malaria y un antígeno proteináceo potenciado con adyuvante en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de malaria, en el que dicho adenovirus recombinante es un adenovirus de simio, canino, bovino o un adenovirus humano de serotipo 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 ó 50, en el que se prefiere que dicho adenovirus recombinante sin capacidad de replicación se use como una composición de sensibilización y dicho antígeno proteináceo potenciado con adyuvante se use como una composición de refuerzo. De acuerdo con una realización de la invención, la misma se refiere a un uso de acuerdo con la invención, en el que el antígeno proteináceo comprende una proteína de CS o un fragmento inmunogénico de la misma, que procede de un parásito que provoca la malaria, preferentemente *Plasmodium falciparum*. Dicho antígeno proteináceo preferentemente comprende una proteína híbrida de proteína CS o un fragmento inmunogénico de la misma fusionado al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HbsAg), en forma de partículas de lipoproteína con HbsAg. RTS,S es un antígeno proteináceo potenciado con adyuvante preferido, mientras que un adyuvante preferido es QS21 y 3D-MPL, preferentemente en una formulación con liposomas que contienen colesterol.

Para la expresión óptima seguida de respuestas inmunes óptimas en mamíferos, preferentemente seres humanos, el ácido nucleico heterólogo usado en la presente invención está optimizado con codón para aumentar la producción de la proteína codificada en un mamífero, preferentemente en un ser humano.

En aun otra realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para vacunar a un mamífero para una infección de malaria que comprende las etapas de sensibilizar a dicho mamífero con un adenovirus recombinante sin capacidad de replicación en un excipiente farmacéuticamente aceptable, comprendiendo dicho adenovirus un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de CS que procede de un parásito que provoca la malaria; y reforzar dicho mamífero con un antígeno proteináceo potenciado con adyuvante que comprende una proteína híbrida de proteína CS o un fragmento inmunogénico de la misma fusionado a HbsAg, en la forma de partículas de lipoproteína con HbsAg. El antígeno proteináceo preferentemente comprende RTS,S, en el que el adyuvante preferido es QS21 y 3D-MPL, preferentemente en una formulación con liposomas que contienen colesterol, mientras que el parásito que provoca la malaria preferido es *Plasmodium falciparum*.

Los adenovirus preferidos que se usan para producir adenovirus recombinantes y usados en los procedimientos de la presente invención pueden ser adenovirus humanos o no humanos tales como adenovirus de simio, de canino y bovino, ya que se prefiere de manera especial el uso de adenovirus que no encuentren inmunidad preexistente en el huésped (ser humano) al que se tiene que administrar el virus recombinante. Los adenovirus de simio y determinados serotipos de adenovirus humanos son muy adecuados para esto, como se divulga en el presente documento. Los adenovirus humanos preferidos que se usan para los procedimientos, usos y kit de partes de acuerdo con la invención son adenovirus humano de los serotipos 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 y 50.

La invención también se refiere a un procedimiento de vacunación de un mamífero para una infección de malaria que usa un kit de partes de acuerdo con la invención. Si un kit de partes de acuerdo con la invención se usa para vacunar a un animal para una infección por malaria usando un régimen de sensibilización-refuerzo preferido como se divulga en el presente documento, el refuerzo preferentemente está seguido por uno o más refuerzos posteriores.

La presente invención se refiere al uso de adenovirus recombinantes como un portador de al menos un antígeno de malaria y se usan en combinación heteróloga con una proteína potenciada con adyuvante en un régimen de sensibilización/refuerzo. Se ha observado de forma sorprendente que la combinación de un vector viral y una proteína potenciada con adyuvante en un régimen de sensibilización/refuerzo heterólogo proporciona una respuesta inmune superior en primates con respecto a las respuestas de células T iniciales y a la longevidad de las respuestas inmunes. En particular, se ha observado que la sensibilización de un mamífero con un vector viral que porta un ácido nucleico que codifica un antígeno seguido por un refuerzo posterior, mediante inyección única o múltiple de antígeno proteináceo potenciado con adyuvante proporciona mejores resultados con respecto a respuestas inmunes cualitativas y/o cuantitativas. Los vectores virales preferidos son vectores adenovirales, más preferentemente vectores adenovirales humanos y aún más preferentemente vectores adenovirales humanos que encuentran niveles bajos de actividad neutralizante en el huésped mamífero al cual se administran los mismos. Los serotipos altamente preferidos son los adenovirus 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 y 50.

De acuerdo con una realización preferida, el antígeno proteináceo y el antígeno codificado por el vector viral son antígenos de malaria, más preferentemente la proteína de circumsporozoito (CS) de *Plasmodium falciparum* o derivados inmunogénicos y/o fragmentos de la misma. Como un ejemplo de este concepto, el polipéptido codificado por el vector viral que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína CS de *P. falciparum*, incluyendo la parte N-terminal, la parte central de región de repetición y la parte C-terminal (con una supresión de los 14 aminoácidos más C-terminales: la secuencia de anclaje CPI), mientras que el antígeno proteináceo comprende la construcción RTS,S, que carece de la región N-terminal.

El antígeno proteináceo potenciado con adyuvante para su uso en cualquiera o todos los aspectos de la invención puede comprender la proteína CS de *P. falciparum* o un fragmento inmunogénico de la misma, que puede estar en forma de una proteína de fusión. Por ejemplo, el antígeno puede comprender una proteína híbrida de proteína CS o un fragmento inmunogénico fusionado al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), proteína híbrida que se puede expresar en células huésped procariontas o eucariotas y que puede tener la forma de partículas de lipoproteína. La proteína de fusión puede comprender por ejemplo sustancialmente toda la parte C-terminal de la proteína CS, cuatro o más repeticiones en tándem de la región inmunodominante y el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg). Por ejemplo la proteína híbrida comprende una secuencia que contiene al menos 160 aminoácidos que es sustancialmente homóloga a la parte C-terminal de la proteína CS y puede estar desprovista de los aminoácidos finales del extremo C de la proteína CS, por ejemplo los últimos 10 a 12 aminoácidos. La proteína híbrida puede estar en forma de partículas de lipoproteína mezcladas, por ejemplo, con HBsAg.

En particular se proporciona una proteína híbrida como se divulga en el documento WO 93/10152, denominada en ese documento "RTS*" pero denominada en el presente documento "RTS", que puede estar en forma de partículas de lipoproteínas mezcladas con HBsAg, denominadas en el presente documento RTS,S. La proporción de proteína híbrida:antígeno S en estas partículas mezcladas es por ejemplo 1:4.

La proteína híbrida denominada "RTS" en el presente documento se generó usando la secuencia del gen de la proteína CS de *P. falciparum* NF54 (clon 3D7; Caspers y col. 1989) y comprende sustancialmente la región completa de 207 a 395 de la proteína CS de *P. falciparum* NF54. La parte de la secuencia de la proteína CS de NF54 (3D7) que está incluida en RTS es la siguiente secuencia de 189 aminoácidos:

DPNANPNANP NANPNANPNA NPNANPNANP NANPNANPNA NPNANPNANP NANPNANPNA NPNANPNANP
 NANPNKNNQG NGQGHNMPND PNRNVDENAN ANSAVKNNNN EEP SDKHIKE YLNKIQNSLS TEWSPCSVTC
 GNGIQVRIKP GSANKPKDEL DYANDIEKKI CKMEKCSSVF NVVNSSIGL (SEC ID N°: 1).

En particular RTS es:

- Un resto de metionina codificado por los nucleótidos 1059-1061 obtenidos de la secuencia del gen TDH3 de *Saccharomyces cerevisiae* (los nucleótidos 1-1058 en esta fase de lectura forman el propio promotor TDH3). (Musti y col. 1983).
- Tres aminoácidos: Met Ala Pro, obtenidos a partir de una secuencia de nucleótidos (1062-1070) creada por el procedimiento de clonación usado para construir el gen híbrido.
- Un tramo de 189 aminoácidos (proporcionado anteriormente, SEC ID N°: 1) codificados por 1071-1637 que representa los aminoácidos 207 a 395 de la proteína CS de *P. falciparum* cepa NF54 (clon 3D7; Caspers y col. 1989).
- Un aminoácido (Gly) codificado por los nucleótidos 1638 a 1640, creado mediante el procedimiento de clonación usado para construir el gen híbrido.
- Cuatro aminoácidos, Pro Val Thr Asn, codificados por los nucleótidos 1641 a 1652 y que representan los cuatro restos carboxi terminales de la proteína preS2 del virus de la hepatitis B (serotipo adw) (Valenzuela y col. 1979).
- Un tramo de 226 aminoácidos, codificado por los nucleótidos 1653 a 2330 y que especifica la proteína S del virus de la hepatitis B (serotipo adw) (Valenzuela y col. 1979).

RTS puede estar en forma de partículas mezcladas, RTS,S, donde la proporción de RTS:S es por ejemplo 1:4.

Aunque la invención no está limitada de ninguna manera a los antígenos de la malaria, la invención se explicará con mayor detalle usando vectores virales que codifican un antígeno de malaria en combinación con un antígeno de malaria proteináceo potenciado con adyuvante. Los expertos en la materia serán capaces de modificar el contenido general proporcionado en el presente documento usando diferentes insertos de antígeno y antígenos proteináceos correspondientes de otros agentes patógenos, incluyendo parásitos, bacterias, virus, levaduras o incluso autoantígenos, incluyendo, pero sin limitación, antígenos tumorales (por ejemplo, PSA, gp100, CEA, MUC1,

Her2/neu y similares).

La presente invención se refiere a un vector adenoviral recombinante sin capacidad de replicación que comprende una secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de *Plasmodium falciparum*. En una realización preferida, dicho vector viral es un adenovirus obtenido de un serotipo seleccionado entre el grupo que consiste en: Ad11, Ad24, Ad26, Ad34, Ad35, Ad48, Ad49 y Ad50. La razón de esta selección de adenovirus humanos es debido a que el uso de adenovirus en general como vectores de vacuna está normalmente obstaculizado por el hecho de que los seres humanos se infectan regularmente con adenovirus de tipo silvestre, lo cual provoca enfermedades leves o inaparentes tales como el resfriado común. Las respuestas inmunes generadas durante una infección de este tipo con un serotipo de tipo silvestre parental pueden influir negativamente sobre la eficacia del serotipo de adenovirus recombinante cuando se usa como un vector de vacunas recombinante posterior, tal como una vacuna frente a malaria en la que se aplican adenovirus. La propagación de los diferentes serotipos de adenovirus en la población mundial humana difiere de un área geográfica a otra. En general, los serotipos preferidos encuentran una actividad neutralizante baja en huésped en casi todo el mundo, como se describe en varios informes en la técnica.

Los inventores de la presente invención ahora han preparado una combinación novedosa entre un adenovirus recombinante y una proteína purificada en un esquema de vacunación secuencial, denominado sensibilización/refuerzo heterólogo, esquema que hace uso de diferentes respuestas inmunes inducidas por los diferentes componentes de la vacuna de sensibilización/refuerzo. La elección del vector recombinante está influida por aquellos que encuentran actividad neutralizante en un porcentaje bajo de la población humana que necesita la vacunación. De forma sorprendente, la combinación de antígeno usando adenovirus como vector y antígeno de proteína potenciado con adyuvante proporciona una mejora significativa en las respuestas inmunes con respecto a aquellas observadas usando cualquier vacuna en solitario. La potenciación inmune se ilustra mediante la detección *in vitro* de respuestas inmunes dadas *in vivo* a macacos Rhesus como se divulga en el presente documento.

En otra realización, el adenovirus sin capacidad de replicación recombinante es un adenovirus de simio, tal como aquellos aislados a partir de chimpancé. Los ejemplos que son adecuados incluyen C68 (también conocido como Pan 9; documento US 6.083.716) y Pan 5, 6 y 7 (documento WO 03/046124).

En un aspecto particular de la invención el vector viral recombinante sin capacidad de replicación comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína CS o una parte inmunogénica o fragmento de la misma. Preferentemente, dicha secuencia de ácido nucleico heterólogo está optimizada con codón para expresión elevada en un mamífero, preferentemente un ser humano. La optimización con codón se basa en el contenido de aminoácido requerido, el uso de codón óptimo general en el mamífero de interés y varios aspectos que se deben evitar para asegurar la expresión apropiada. Tales aspectos pueden ser sitios de corte y empalme de donador o aceptor, codones de parada, sitios Chi, tramos poli(A), secuencias con alto contenido en GC y AT, cajas TATA internas, etc. Los procedimientos de optimización con codón para huéspedes mamíferos los conocen bien los expertos y se pueden encontrar en varios lugares en la bibliografía de biología molecular.

En una realización preferida, la invención se refiere a un vector adenoviral recombinante sin capacidad de replicación de acuerdo con la invención, en el que el contenido de adenina más timina en dicho ácido nucleico heterólogo, en comparación con el contenido de citosina más guanina, es menos del 87 %, preferentemente menos del 80 %, más preferentemente menos del 59 % y lo más preferentemente igual a aproximadamente el 45 %. La invención proporciona en una realización un vector adenoviral recombinante sin capacidad de replicación, en el que la proteína CS es una cualquiera de las proteínas CS que se divulgan en el documento WO 2004/055187, más preferentemente la proteína CS de *P. falciparum* o un fragmento inmunogénico de la misma.

La producción de vectores adenovirales recombinantes que portan genes heterólogos se conoce bien en la técnica y normalmente implica el uso de una línea de células de empaquetamiento, construcciones adaptadoras y cósmidos y la supresión de al menos una parte funcional de la región E1 del genoma adenoviral (véase también más adelante sistemas de empaquetamiento y líneas de células preferidas).

La invención también se refiere a kits que comprenden como componentes por una parte un vector adenoviral recombinante que encuentra actividad neutralizante baja en el huésped y por otra parte una proteína purificada, en la que se prefiere que la proteína purificada se proporcione en una mezcla con un adyuvante. Un adyuvante preferido es QS21 y 3D-MPL, preferentemente en una formulación con liposomas que contienen colesterol. Los componentes se usan en una estrategia de administración de vacuna de sensibilización/refuerzo heteróloga en la que se prefiere administrar en primer lugar el vector adenoviral recombinante como un agente de sensibilización y después la proteína purificada como un agente de refuerzo, refuerzo que se puede repetir más de una vez. Los componentes normalmente se contienen en vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica y se usan exhaustivamente en una amplia diversidad de productos terapéuticos. Preferentemente, se aplican vehículos que trabajan bien en vacunas. Más preferidas son las vacunas que comprenden además un adyuvante. En la técnica se conoce que los adyuvantes aumentan adicionalmente la respuesta inmune a un antígeno aplicado. La invención también se refiere al uso de un kit de acuerdo con la invención en el tratamiento terapéutico, profiláctico o de diagnóstico de malaria.

La presente invención se refiere a un procedimiento para tratar a un mamífero para una infección por malaria o

prevenir una infección por malaria en un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento (en cualquier orden o de forma simultánea) las etapas de administrar un adenovirus recombinante que porta un antígeno de *P. falciparum*; y administrar al menos una proteína de *P. falciparum* purificada, dicha proteína mezclada con un adyuvante. Preferentemente el adenovirus recombinante se selecciona entre el grupo que consiste en Ad24, Ad26, Ad34, Ad35, Ad48, Ad49 y Ad50, aunque también se prefiere que el adenovirus recombinante porte el gen que codifica la proteína CS o un fragmento inmunogénico de la misma. La proteína purificada preferida que se usa en combinación con el adenovirus recombinante es RTS,S, mientras que un adyuvante preferido es QS21 y 3D-MPL, preferentemente en una formulación con liposomas que contienen colesterol.

La fuerza motriz detrás del desarrollo de las respuestas inmunes son las citoquinas, varios mensajeros de proteína identificados que sirven para ayudar a las células del sistema inmune y conducir la respuesta inmune eventual a una respuesta Th1 o Th2. Por tanto, los niveles elevados de las citoquinas de tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes mediadas por células hacia el antígeno dado, mientras que niveles elevados de las citoquinas de tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales hacia el antígeno. Es importante recordar que la diferenciación de respuestas inmunes de tipo Th1 y Th2 no es absoluta. En realidad, un individuo soportará una respuesta inmune que se describe como predominantemente Th1 o predominantemente Th2. Sin embargo, con frecuencia es conveniente considerar las familias de citoquinas en términos de lo que se describe en los clones de células T CD4+ por Mosmann y Coffman (1989). Tradicionalmente, las respuestas de tipo Th1 están asociadas con la producción de INF- γ y citoquinas IL-2 por los linfocitos T. Otras citoquinas con frecuencia asociadas directamente con la inducción de respuestas inmunes de tipo Th1 no se producen por las células T, tales como IL-12. Por el contrario, las respuestas de tipo Th2 están asociadas con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y factor de necrosis tumoral (TNF- α).

Adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen una sal de aluminio tal como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio, pero también puede ser una sal de calcio, hierro o cinc o puede estar en una suspensión insoluble de tirosina acilada o azúcares acilados, polisacáridos derivatizados catiónicamente o anióticamente, polifosfocenos o liposomas de montanide.

En la formulación de vacunas para su uso en la invención, en el contexto del vector de adenovirus, se puede o no administrar un adyuvante. En el caso del componente de proteína de la combinación, la composición de adyuvante se puede seleccionar para inducir una respuesta Th1 preferencial. Adicionalmente, otras respuestas, incluyendo otras respuestas humorales, también se pueden inducir.

Determinados adyuvantes de vacunas son particularmente adecuados para la estimulación de respuesta de citoquina de tipo Th1 o Th2. Tradicionalmente, los mejores indicadores del equilibrio Th1:Th2 de la respuesta inmune después de una vacunación o infección incluyen la medición directa de la producción de citoquinas Th1 o Th2 por los linfocitos T *in vitro* después de re-estimulación con antígeno y/o la medición de la proporción de IgG1 : IgG2a de respuestas de anticuerpo específico a antígeno. Por tanto, un adyuvante de tipo Th1 es uno que estimula poblaciones de células T aisladas para producir niveles elevados de citoquinas de tipo Th1 cuando se re-estimulan con antígeno *in vitro* e induce respuestas de inmunoglobulina específicas a antígeno asociadas con el isotipo de tipo Th1. Por ejemplo, los inmunoestimulantes de tipo Th1 que se pueden formular para producir adyuvantes adecuados para su uso en la presente invención pueden incluir monofosforil lípido A, en particular el monofosforil lípido A 3-O-desacilado (3D-MPL). 3D-MPL es un adyuvante bien conocido fabricado por Ribi Immunochem, Montana. Químicamente con frecuencia se suministra como una mezcla de monofosforil lípido A 3-O-desacilado con cadenas 4, 5 ó 6 aciladas. El mismo se puede purificar y preparar mediante los procedimientos descritos en el documento GB 2122204B, cuya referencia también divulga la preparación de difosforil lípido A y las variantes 3-O-desaciladas del mismo. Otros lipopolisacáridos purificados y sintéticos se han descrito (documentos 6.005.099, EP 0729473 B1, EP 0549074 B1). En una realización, 3D-MPL está en forma de una formulación particulada que tiene un tamaño de partícula pequeño menor de 0,2 μ m de diámetro y su procedimiento de preparación se divulga en el documento EP 0689454.

Las saponinas son otro ejemplo de inmunoestimulantes de Th1 que se pueden usar con la invención. Las saponinas son adyuvantes bien conocidos. Por ejemplo, Quil A (obtenido de la corteza del árbol sudamericano Quillaja Saponaria Molina), y fracciones del mismo, se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.057.540 y el documento EP 0362279 B1. Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones purificadas por HPLC de Quil A) se han descrito como adyuvantes sistémicos potentes y el procedimiento de su producción se divulga en la Patente de Estados Unidos N° 5.057.540 y el documento EP 0362279 B1. También se describe en estas referencias el uso de QS7 (una fracción no hemolítica de Quil-A), que actúa como un adyuvante potente para las vacunas sistémicas. Las combinaciones de QS21 y polisorbato o ciclodextrina también se conocen (documento WO 99/10008). Los sistemas de adyuvantes particulados que comprenden fracciones de QuilA, tales como QS21 y QS7 se describen en los documentos WO 96/33739 y WO 96/11711.

Otro ejemplo de un estimulante es un oligonucleótido inmunoestimulador que contiene dinucleótidos CpG no metilados ("CpG"). CpG es una abreviación de motivos de dinucleótido citosina-guanosina presentes en el ADN. CpG se conoce en la técnica como un adyuvante cuando se administra mediante las vías tanto sistémica como mucosal (documentos WO 96/02555, EP 0468520). Históricamente, se ha observado que la fracción de ADN del bacilo de Calmette-Guerin (BCG) podría ejercer un efecto antitumoral. En estudios adicionales, los oligonucleótidos

5 sintéticos obtenidos de las secuencias del gen de BCG demostraron ser capaces de inducir efectos inmunoestimuladores (tanto *in vitro* como *in vivo*). Los autores de estos estudios concluyeron que determinadas secuencias palindrómicas, que incluyen un motivo CG central, portaban esta actividad. El análisis detallado ha demostrado que el motivo CG tiene que estar en un contexto de secuencia determinado y que tales secuencias son comunes en ADN bacteriano pero son raras en ADN de vertebrado. La secuencia inmunoestimuladora es con frecuencia: Purina, Purina, C, G, pirimidina, pirimidina; en la que el motivo CG no está metilado, pero se conocen otras secuencias CpG no metiladas que son inmunoestimuladoras y se pueden usar en la presente invención.

10 En determinadas combinaciones de los seis nucleótidos, puede estar presente una secuencia palindrómica. Varios de estos motivos, como repeticiones de un motivo o una combinación de diferentes motivos, pueden estar presentes en el mismo oligonucleótido. La presencia de una o más de estas secuencias inmunoestimuladoras que contienen oligonucleótidos pueden activar diversos subconjuntos inmunes, incluyendo linfocitos citolíticos naturales (que producen interferón y que tienen actividad citolítica) y macrófagos. Otras secuencias que contienen CpG no metilada que no tienen esta secuencia de consenso también se ha demostrado ahora que son inmunomoduladoras. Cuando se formula en vacunas, CpG generalmente se administra en solución libre junto con el antígeno libre (documento WO 96/02555, 68) o conjugado covalentemente a un antígeno (documento WO 98/16247) o formulado con un vehículo tal como hidróxido de aluminio (antígeno de superficie de la Hepatitis).

15 Tales inmunoestimuladores como se ha descrito anteriormente se pueden formular junto con vehículos, tales como, por ejemplo, liposomas, emulsiones de aceite en agua y/o sales metálicas, incluyendo sales de aluminio (tales como hidróxido de aluminio). Por ejemplo, 3D-MPL se puede formular con hidróxido de aluminio (documento EP 0689454) o emulsiones de aceite en agua (documento WO 95/17210); QS21 se puede formular provechosamente con liposomas que contienen colesterol (documento WO 96/33739), emulsiones de aceite en agua (documento WO 95/17210) o alumbre (documento WO 98/15287); CpG se puede formular con alumbre o con otros vehículos catiónicos.

20 Las combinaciones de inmunoestimuladores también se pueden usar, tales como una combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina (documentos 94/00153; WO 95/17210; WO 96/33739; WO 98/56414; WO 98/05355; WO 99/12565; WO 99/11241) o una combinación de QS21 y 3D-MPL como se divulga en el documento WO 94/00153. Como alternativa, una combinación de CpG más una saponina tal como QS21 también se puede usar en la presente invención. Por tanto, los sistemas de adyuvante adecuados incluyen, por ejemplo, una combinación de monofosforil lípido A, tal como 3D-MPL, junto con una sal de aluminio. Otra realización combina un monofosforil lípido A y un derivado de saponina, tal como la combinación de QS21 y 3D-MPL como se divulga en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica donde el QS21 se inactiva en liposomas que contienen colesterol (DQ) como se divulga en el documento WO 96/33739. Otra formulación de adyuvante que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210. En otra realización, los oligonucleótidos CpG se usan solos o junto con una sal de aluminio.

25 Un adyuvante adecuado para su uso en la presente invención es un adyuvante estimulante de Th1 preferencial, por ejemplo un adyuvante que comprende una saponina tal como QS21 o un derivado de monofosforil lípido A tal como 3D-MPL, o un adyuvante que comprende ambos de estos opcionalmente junto con liposomas que contienen colesterol. Una combinación de QS21 y 3D-MPL en una formulación con liposomas que contienen colesterol se describe por ejemplo en el documento WO 96/33739.

30 Las ventajas de la presente invención son múltiples. Los virus recombinantes, tales como adenovirus recombinantes, se pueden producir en títulos muy elevados usando células que se consideran seguras y que pueden crecer en suspensión hasta volúmenes muy elevados, usando medio que no contiene ningún componente obtenido de animal o humano. También, se conoce que los adenovirus recombinantes provocan una respuesta inmune espectacular frente a la proteína codificada por la secuencia de ácido nucleico heteróloga en el genoma adenoviral. La presente invención combina estas características en un vector que porta el gen de circumsporozoito de *P. falciparum* con el uso de proteína potenciada con adyuvante para reforzar las respuestas. Además, el gen se ha optimizado con codón para proporcionar un nivel de expresión que sea adecuado para proporcionar una respuesta inmune apropiada en seres humanos. La presente invención proporciona una vacuna frente a infecciones por malaria, aprovechándose de adenovirus que no encuentran títulos elevados de anticuerpos neutralizantes. Los adenovirus altamente preferidos para este fin son de serotipo 11 y 35 (Ad11 y Ad35, véanse los documentos WO 00/70071 y WO 02/40665).

35 El contenido de ácido nucleico entre el patógeno que provoca la malaria, tal como *P. falciparum* y el huésped de interés, tal como *Homo sapiens* es muy diferente. La invención proporciona ácidos nucleicos optimizados con codón que proporcionan niveles de expresión más elevados en mamíferos, tales como seres humanos.

40 El uso de diferentes entidades para regímenes de sensibilización/refuerzo como se divulga en el presente documento proporciona un procedimiento de vacuna que proporciona respuestas inmunes apropiadas de brazos tanto celular como humoral del sistema inmune. La misma implica células T CD8+, células T CD4+ y anticuerpos. Ninguna de estas vacunas en solitario establece una respuesta inmune sostenible que genere niveles óptimos de células T CD8+, células T CD4+ y anticuerpos específicos de antígeno. Además, el orden en el que se administran los diferentes componentes puede alterar estas respuestas inmunes y puede dar origen a periodos diferentes de protección posible frente a infecciones futuras. Los procedimientos y kits de la presente invención posibilitan

provocar una respuesta inmune que se ocupa de todas las etapas diferentes del ciclo de vida del parásito en seres humanos, desde esporozoitos y merozoitos circulantes libres hasta hepatocitos y RBC infectados. Además, los mismos proporcionan una protección sostenida frente a infecciones por malaria durante un periodo de tiempo prolongado.

5 En una realización preferida, la invención se refiere al uso de adenovirus recombinantes que no tienen capacidad de replicación a través de la eliminación de al menos parte de la región E1 en el genoma adenoviral, ya que la región E1 es necesaria para los procedimientos de replicación, transcripción, traducción y empaquetamiento de adenovirus preparados recientemente. Los vectores con E1 suprimido generalmente se producen en líneas celulares que complementan las funciones E1 suprimidas. Tales líneas celulares y el uso de las mismas para la producción de virus recombinantes se han descrito exhaustivamente y se conocen bien en la técnica. Preferentemente, las células PER.C6[©], representadas por las células depositadas en la ECACC N° 96022940 en la Colección Europea de Cultivos de Células Animales (ECACC) en el Centro de Microbiología Aplicada e Investigación (CAMR, RU) o derivados de las mismas se están usando para evitar la producción de adenovirus con capacidad de replicación (rca). En otra realización preferida, se están aplicando sólo las que soportan el crecimiento de adenovirus recombinantes diferentes a aquellos obtenidos para adenovirus de serotipo 5 (Ad5). Se hace referencia a las publicaciones WO 97/00326, WO 01/05945, WO 01/07571, WO 00/70071, WO 02/40665 o WO 99/55132, para procedimientos y medios para obtener reservas adenovirales sin rca de Ad5 así como otros serotipos de adenovirus, tales como Ad35 sin capacidad de replicación recombinante que se puede producir en células HER inmortalizadas con E1 a partir de Ad35 o en células PER.C6[©] que comprenden además genes E1 de Ad35 para proporcionar complementación apropiada de adenovirus de tipo B.

Se ha de indicar en el presente documento que en los documentos publicados WO 00/03029, WO 02/24730, WO 00/70071 y WO 02/40665, Ad50 se ha denominado por error Ad51. El serotipo Ad51 al que se hace referencia en las publicaciones mencionadas es el mismo que el serotipo Ad50 en una publicación de De Jong y col. (1999), en la que se indicó como un adenovirus del grupo B. En aras de la claridad, Ad50 como se usa en el presente documento, es el serotipo Ad50 del grupo B que se menciona en De Jong y col. (1999).

Las vacunas de la presente invención se usan normalmente en entornos de sensibilización/refuerzo, por ejemplo, Ad/proteína; proteína/Ad; proteína/Ad/Ad; Ad/proteína/Ad; Ad/Ad/proteína, Ad/proteína/proteína/proteína, Ad/proteína/vector viral/proteína, etc., etc. Se puede prever que una combinación con otro tipo de vacuna (tal como ADN desnudo o un vector viral recombinante diferente de adenovirus) se puede aplicar en combinación con los agentes de sensibilización/refuerzo de la presente invención. También se pueden usar antígenos o polipéptidos de malaria.

Una secuencia es "obtenida" tal como se usa en el presente documento si un ácido nucleico se puede obtener a través de la clonación directa a partir de secuencias de tipo silvestre obtenidas de los virus de tipo silvestre, mientras que las mismas también se obtienen por ejemplo a través de PCR mediante el uso de diferentes trozos de ADN como un molde. Esto significa que tales secuencias pueden estar en la forma de tipo silvestre así como en una forma alterada. Otra opción para alcanzar el mismo resultado es través de la combinación de ADN sintético. Se ha de comprender que "obtenido" no significa exclusivamente una clonación directa del ADN de tipo silvestre. Un experto en la materia también será consciente de las posibilidades de la biología molecular para obtener formas mutantes de un trozo determinado de ácido nucleico. Las expresiones "parte funcional, derivado y análogos de los mismos" se han de entender como equivalentes de la secuencia de ácido nucleico con la que están relacionadas. Un experto en la materia apreciará el hecho de que determinadas supresiones, intercambios, mutaciones (puntuales), adiciones, etc. pueden aun dar como resultado una secuencia de ácido nucleico que tiene una función similar a la secuencia de ácido nucleico original y deben producir un polipéptido similar o incluso idéntico una vez traducidas. Por lo tanto, se ha de comprender que tales alteraciones que no alteran de forma significativa la funcionalidad de la secuencia de ácido nucleico están dentro del alcance de la presente invención. Si un vector adenoviral determinado se obtiene a partir de un serotipo adenoviral determinado de elección, también se ha de comprender que el producto final se puede obtener a través de vías indirectas, tales como clonación directa y síntesis de determinados trozos de ADN genómico, usando metodología conocida en la técnica. Determinadas supresiones, mutaciones y otras alteraciones del contenido genómico que no alteran los aspectos específicos de la invención se considera que son parte de la invención. Los ejemplos de tales alteraciones son por ejemplo supresiones en la cadena principal viral para posibilitar la clonación de trozos más grandes de ácidos nucleicos heterólogos. Los ejemplos de tales mutaciones son por ejemplo supresiones de E3 o supresiones y/o alteraciones en las regiones que codifican las proteínas E2 y/o E4 de adenovirus. Tales cambios aplicados a la cadena principal adenoviral se conocen en la técnica y con frecuencia se aplican, ya que el espacio es un factor limitante para que el adenovirus se empaquete; esto es una razón principal para suprimir determinadas partes del genoma adenoviral. Otras razones para alterar las regiones E2, E3 y/o E4 del genoma pueden estar relacionadas con la estabilidad o integridad del vector adenoviral, como por ejemplo se describe en los documentos WO 03/104467 y WO 2004/001032. Estas solicitudes se refieren entre otros al uso de un gen E4 o f6 a partir de un serotipo de un subgrupo en la cadena principal de un adenovirus de otro subgrupo, para asegurar la compatibilidad entre la actividad de E4 o f6 y la actividad de E1B-55K durante la replicación y el empaquetamiento en una línea de células de empaquetamiento. Las mismas también se refieren al uso de un promotor pIX en funcionamiento apropiado para obtener niveles de pIX más elevados y un vector adenoviral recombinante más estable.

- 5 “Sin capacidad de replicación” como se usa en el presente documento significa que los vectores virales no se replican en células que no son complementarias. En células complementarias, las funciones necesarias para la replicación y por tanto la producción del vector viral, se proporciona por la célula complementaria. Los vectores virales sin capacidad de replicación de la presente invención no portan todos los elementos que posibilitan la replicación en cualquier célula huésped diferente a una célula complementaria.
- 10 “Heterólogo” como se usa en el presente documento junto con ácidos nucleicos significa que la secuencia de ácido nucleico se obtiene a partir de una fuente original diferente a las versiones de tipo silvestre de los vectores virales en los que el ácido nucleico heterólogo se clona. Por ejemplo en el caso de adenovirus, el ácido nucleico heterólogo que se clona en el vector adenoviral sin capacidad de replicación, no es una secuencia de ácido nucleico adenoviral, sino que procede de otro agente patógeno de interés.
- 15 “Heterólogo” como se usa en el presente documento junto con estrategias de vacuna de sensibilización-refuerzo significa que dos o más componentes separados, ilustrados por un vector de adenovirus no replicativo recombinante y una proteína potenciada con adyuvante se usan en combinación deliberada, en lugar de un componente que se está administrando varias veces, como es habitual en la industria hasta ahora.
- 20 “Antígeno” como se usa en el presente documento significa cualquier antígeno obtenido a partir de una fuente que provoca una respuesta inmune en un huésped al que se administra el determinante de forma deliberada. El antígeno puede ser de una fuente externa, por ejemplo un patógeno, un parásito o incluso un autoantígeno. Los ejemplos de antígenos de *Plasmodium* que se pueden administrar mediante el uso de los virus recombinantes sin capacidad de replicación de la presente invención son la proteína de circumsporozoito (CS), el polipéptido SE36, el polipéptido C-terminal de 119 kDa de la proteína de superficie de merozoito (MSP-1p19), MSP-1, MSP-1p42, el Antígeno De Merozoito Apical 1 (AMA-1), el Antígeno de Etapa Hepática 1 (LSA-1) o el Antígeno de Etapa Hepática-3 (LSA-3) o un fragmento de cualquiera de los mencionados anteriormente. En un aspecto preferido la invención se refiere a la proteína de circumsporozoito (CS) de *P. falciparum*.
- 25 “Optimizado con codón” como se usa en el presente documento significa que el contenido de ácido nucleico de una secuencia se ha alterado para apoyar niveles de expresión suficientemente elevados de la proteína de interés en un huésped de interés al cual se administra el gen que codifica dicha proteína. Los niveles de expresión suficientemente elevados en este contexto significan que los niveles de proteína deben ser lo suficientemente elevados para provocar una respuesta inmune en el huésped con el fin de proteger frente a la infección o frente a la enfermedad. Se conoce en la técnica que algunas vacunas proporcionan respuesta inmune en seres humanos, a través de lo cual aproximadamente el 60 % de los individuos vacunados está protegido frente a enfermedades inducidas por exposiciones posteriores al patógeno (por ejemplo, esporozoitos). Por lo tanto los niveles de expresión se considera que son suficientes si el 60 % o más de los individuos tratados están protegidos frente a infecciones posteriores. Se cree que con las combinaciones de aspectos adenovirales que se pueden aplicar y la elección del antígeno como se divulga en el presente documento, tales porcentajes se pueden alcanzar. Preferentemente, el 85 % de los individuos está protegido, mientras que es más preferido tener una protección frente a una exposición posterior en más del 90 % de los huéspedes vacunados. Los ácidos nucleicos divulgados en la presente invención son optimizados con codón para expresión en seres humanos. De acuerdo con Narum y col. (2001), el contenido de adenina más timina (A+T) en ADN de *Homo sapiens* es aproximadamente el 59 %, en comparación con el porcentaje de citosina más guanina (C+G). El contenido de adenina más timina en *P. falciparum* global es aproximadamente el 80 %. El contenido de adenina más timina en el gen de CS de *P. falciparum* es aproximadamente el 87 %. Para obtener protección suficiente se cree que es necesario mejorar los niveles de producción en el huésped. Una manera de conseguir esto es ajustar el uso de codón para mantener la misma secuencia de aminoácidos final, pero usar secuencias de codón más típicas de expresión de mamífero. Para esto, los vectores virales recombinantes sin capacidad de replicación de acuerdo con la invención tienen un contenido de adenina más timina en los ácidos nucleicos heterólogos de la presente invención de menos del 87 %, preferentemente menos del 80 % y más preferentemente menos de o igual a aproximadamente el 59 %. En base al uso de codón en seres humanos y el contenido de aminoácidos de los genes CS de *P. falciparum* y *yoelii*, los porcentajes de los genes optimizados con codón fueron incluso más bajos, alcanzando aproximadamente el 45 % para el contenido de aminoácidos como se divulga por la presente invención. Por lo tanto, en lo que se refiere a los genes de CS se prefiere tener un contenido de adenina más timina de aproximadamente el 45 %. Se ha de comprender, que si se ha de tratar una especie diferente a los seres humanos, que puede tener una concentración de adenina más timina diferente (menos o más del 59 %) y/o un uso de codón diferente, que los genes que codifican las proteínas CS de la presente invención se pueden ajustar para adaptarse al contenido necesario y dar origen a niveles de expresión adecuados para ese huésped particular. Por supuesto, no se puede excluir que cambios ligeros en el contenido pueden dar como resultado cambios en el nivel de expresión ligeros en diferentes áreas geográficas alrededor del mundo. También se ha de comprender que cambios ligeros en el número de repeticiones incluidas en la secuencia de aminoácidos de las proteínas, que los porcentajes pueden diferir en consecuencia. Otros antígenos de interés se pueden modificar de forma similar. Todos estos contenidos ajustados son parte de la presente invención.
- 50 La proteína denominada RTS,S es una proteína de fusión que consiste en la mitad C-terminal de la proteína CS de *P. falciparum* (17 de los 41 repeticiones NANP más la mayoría de la parte C-terminal) expresada como una proteína de fusión con el antígeno de superficie de la Hepatitis B.

Una de las ventajas claras ofrecidas por los vectores adenovirales sin capacidad de replicación es la patogenicidad menor de los virus parentales y la carencia documentada de enfermedad significativa provocada por estos vectores en cualquier individuo, incluyendo aquellos que están inmunosuprimidos. El trabajo en el modelo de ratón de malaria, *P. yoelii*, indicó que las construcciones de adenovirus recombinante que expresan la proteína CS no sólo generan respuestas inmunes celulares destacadas, sino que proporcionan protección excelente frente a la infección. Por lo tanto, en un esfuerzo por mejorar la intensidad de la respuesta de células T y la longevidad de la respuesta inmune global a CS, los inventores de la presente invención decidieron combinar un enfoque adenoviral con el enfoque de proteína recombinante en una estrategia de sensibilización-refuerzo heteróloga novedosa.

Desafortunadamente, el ratón no es el modelo ideal para pronosticar respuestas en seres humanos. Esto es particularmente cierto para el Adenovirus 35 (Ad35). El vector sin capacidad de replicación es Adenovirus 5 (Ad5), que ha demostrado algunos problemas con la optimización de sus capacidades de vector debido a la endemicidad extendida de este virus y al hecho de que una proporción sustancial de la mayoría de las poblaciones humanas globales tienen inmunidad preexistente hacia el virus parental. Ad35 tiene el potencial de demostrar utilidad potenciada como un vector de vacuna. La disponibilidad de construcciones que portan CSP tanto Ad5 como Ad35 permitió la evaluación de dos inmunizaciones adenovirales heterólogas secuenciales con construcciones diferentes específicamente para la cuestión de la inmunidad de CS.

Las células dendríticas (CD) son las células presentadoras de antígeno más potentes en el organismo y el hecho de que tanto Ad5 como Ad35 se dirigen a CD humanas y de Rhesus es uno de los aspectos de su biología que las hace tan excelentes vectores de vacunas. Sin embargo, únicamente Ad5 infecta eficazmente las CD murinas; Ad35 únicamente infecta de manera fiable CD de primates. Por tanto, aunque las cuestiones de potencia básicas acerca de las construcciones de Ad35 se pueden responder en modelos de animales pequeños, las cuestiones de inmunogenicidad real que implican Ad35 únicamente se pueden preguntar en primates no humanos.

Los inventores decidieron examinar las combinaciones de sensibilización-refuerzo de RST,S con vectores adenovirales que contienen el gen de CS para determinar si las respuestas celulares y/o humoral anti-malaria serían una mejora frente a las respuestas observadas en RTS,S en solitario. Además, se optimizó un régimen para dos dosis de vacuna de adenovirus en solitario.

Ejemplo

Vacunación de sensibilización/refuerzo heteróloga usando vectores adenovirales recombinantes y proteína potenciada con adyuvante purificada en monos Rhesus.

Los objetivos del experimento eran evaluar RTS,S seguido por Ad35 y Ad35 seguido por RTS,S, en una comparación directa con un régimen de inmunización de tres dosis de RTS,S convencional y un régimen de dos dosis de Ad35 convencional. Un objetivo secundario era optimizar el régimen de adenovirus de dos dosis. Se estudiaron las respuestas inmunes serológica y celular durante y después de varios regímenes diferentes de estas construcciones en combinación.

El macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) es un excelente modelo para la respuesta inmune humana debido a su relación filogenética mucho más cercana. Los alelos de CMH de clase II están particularmente bien conservados; la generación de algunos alelos compartidos se estima en hace 25 millones de años, antes de la especiación de seres humanos y Rhesus. Por tanto, existe un uso de epítipo similar en presentación de antígeno a células Th, que potencia normalmente el valor predictivo del modelo. Más importante, el modelo de mono Rhesus ha demostrado ser en el pasado altamente predictivo de las respuestas de inmunogenicidad humanas tanto para antígenos de malaria como de VIH, otra enfermedad humana para la cual el desarrollo de una vacuna ha estado obstaculizado por la complejidad de la respuesta inmune.

Ya se han realizado experimentos preliminares en ratones con construcciones de CS adenoviral de la malaria de ratón *P. yoelii* que demostró excelente inmunogenicidad y eficacia protectora. Sin embargo, la larga historia de intentos fallidos para extrapolar directamente el modelo de malaria de ratón a seres humanos en la búsqueda del desarrollo de vacunas para malaria falciparum demanda una etapa intermedia en un modelo de primate no humano. El macaco Rhesus representa la mejor elección de especie debido a la base de datos exhaustiva de información previa en estas vacunas en esta especie, debido a la proximidad filogenética de seres humanos, debido a que su tamaño permite que las muestras de sangre tengan un volumen suficiente para asegurar una evaluación adecuada de las respuestas inmunes y debido a que existen reactivos y ensayos que ya están optimizados para esta especie y por lo tanto no requieren protocolos auxiliares y muchos años para su desarrollo. Adicionalmente, las construcciones de adenovirus 35 únicamente se pueden ensayar apropiadamente en primates no humanos, debido a la incapacidad de este virus de invadir eficazmente las células dendríticas de otros mamíferos.

Las construcciones y la producción de los adenovirus sin capacidad de replicación recombinantes que portan el gen que codifica CS de *P. falciparum* (Ad5CS y Ad35CS) usados en este estudio se han descrito con mayor detalle en los ejemplos del documento WO 2004/055187 (clon 02-659; véase la figura 2 en ese documento). En resumen, estos adenovectores comprenden un gen heterólogo que codifica la proteína CS con una secuencia de aminoácidos que es similar a la proteína CS de la cepa NF54, clon 3D7, que tiene entre otros, una secuencia señal N-terminal, 27

repeticiones NANP, un grupo de 3 repeticiones NVDP y una repetición NVDP separada, el epítipo universal (Lockyer y col. 1989; Zevering y col. 1994; Nardin y col. 2001) y una supresión de los últimos 14 aminoácidos (en el extremo C). La diferencia con la proteína de RTS,S es que RTS,S carece de la secuencia señal N-terminal y una porción grande de la región de repetición, así como la mayoría de la secuencia señal de anclaje GPI localizada en el extremo C-terminal que también está ausente en las construcciones adenovirales.

El experimento fue un estudio de seguridad e inmunogenicidad aleatorizado, ciego de diversas combinaciones y estrategias de temporización para optimización de estrategias de sensibilización-refuerzo de RTS,S con construcciones que portan CS de Ad5 y Ad35 (Ad5CS y Ad35CS) y para optimización de Ad5CS y Ad35CS en solitario. El mejor régimen previo frente al cual se compararon las estrategias nuevas fue tres dosis intramusculares de 50 µg de RTS,S con adyuvante proporcionadas a 0, 1 y 3 meses. Este fue el Grupo 1, el grupo de Control Positivo. Todos los grupos se describen en la Tabla 1A. En todos los casos el adyuvante estaba formado por 50 µg de 3D-MPL, 50 µg de QS21, en una formulación con liposomas que contienen colesterol como se describe en el documento WO 96/33739.

El Grupo 2 recibió dos dosis de RTS,S/Adyuvante a 0 y 1 mes seguido por una dosis de Ad35CS a los 3 meses. El Grupo 3 recibió una dosis de Ad35CS el mes 0 seguido por dos dosis de RTS,S/adyuvante a los 1 y 3 meses.

Los Grupos 4, 5 y 6 recibieron únicamente construcciones adenovirales. Antes de la experiencia con dos dosis de construcciones de adenovirus 5 en diferentes enfermedades se ha indicado que las respuestas inmunes serológica y celular se obtienen cuando el intervalo entre las inmunizaciones es de al menos 6 meses. Debido a la necesidad de evaluar las construcciones de Ad35 en seres humanos o primates no humanos, el tiempo óptimo entre dosis para este vector aún no se había establecido. Por tanto, el Grupo 4 recibió dos dosis de Ad35CS en una programación de 0, 3 meses (para un control directo de los grupos de proteínas) y el Grupo 5 obtuvo dos dosis en una programación de 0, 6 meses. Con el fin de evaluar la cuestión de si dos dosis de la misma construcción de adenovirus eran inferiores a la alternancia de las construcciones para la proteína CS, el Grupo 5 se comparó con el Grupo 6, que recibió Ad5CS seguido por Ad35CS en el programa de 0, 6 meses.

Finalmente, el Grupo de control 7 recibió dos dosis de Ad35 simple (sin inserto de gen de malaria) a los 0 y 3 meses para servir como un grupo de control de inmunización para evaluaciones de inmunogenicidad.

Los sitios de inyección se pinzaron y se marcaron claramente para facilitar la observación de la reactogenicidad de la vacuna. Adicionalmente los animales se sedaron y el sitio de inyección se examinó directamente para determinar signos de induración, inflamación, calor, enrojecimiento u otra anomalía 24, 48 y 72 h y 7 y 14 días después de la inyección. Aunque los signos de toxicidad sistémica no se esperaban, los animales también se sedaron y examinaron en estos puntos de tiempo para determinar linfadenopatía, celulitis, formación de abscesos, artritis, anorexia y pérdida de peso y sus valores de química hematológica y clínica se supervisaron para determinar alteraciones. Se extrajo sangre al momento de la inyección y 24, 48, 72 h y 7 y 14 días después de cada inyección para un recuento sanguíneo completo (CBC) y para un panel de ensayos de química clínica que incluía (pero no necesariamente limitado a) determinaciones de BUN, creatinina, AST, ALT, CGT y CK. Se recogieron muestras fecales para confirmar la ausencia de vector no replicativo y se almacenaron a -70 °C en cada uno de los días 0-10 para cada inyección de adenovirus para ensayos de adenovirus posterior.

Se recogieron 1-3 ml de suero en el momento de y 1, 2 y 4 semanas después de cada inyección y al menos una vez al mes a partir de entonces para determinar la naturaleza y magnitud de la respuesta de anticuerpo a CS R32 (la región de la repetición de la proteína CS usada para desarrollar el ensayo de ELISA estandarizado para la proteína CS, véase más adelante) mediante ELISA. Las muestras de suero se almacenaron a -70 °C hasta su uso y las muestras se procesaron en lote cerca del final del experimento para minimizar la variabilidad intraensayo. Los volúmenes de suero recogidos eran adecuados de forma que para cada inyección de adenovirus, 0,5-1,1 ml de suero de los Días 0, 1, 7 y 14 y al menos cada 4 semanas a partir de entonces se pueden usar para la determinación del título de anticuerpo anti-adenovirus. Se recogieron volúmenes grandes (20-40 ml) de sangre anti-coagulada con heparina o EDTA para recolecciones de células antes de la primera inmunización, 4 semanas después de la segunda inmunización (si las demandas de volumen lo permiten), 4 semanas después de la tercera inmunización y 6 meses después de la tercera inmunización. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se concentraron a partir de estas muestras usando procedimientos convencionales de separación por centrifugación de densidad. Aunque los rendimientos de células pueden ser altamente variables de un animal individual a otro, en general a mayor volumen de la muestra, mayor será el número de células recogidas. Debido a que es imposible pronosticar la recuperación de células exacta, se prefiere tomar una muestra grande siempre que sea posible de forma de que se obtengan suficientes células para repetir los ensayos con fines de validez estadística. Las células se congelaron para permitir el procesamiento de lote en un punto de tiempo posterior y de esa manera mejorar el control de calidad. Las células se congelaron en suero autólogo con DMSO al 10 % a un índice de reducción de temperatura controlado y se almacenaron en nitrógeno líquido en fase vapor durante al menos una semana antes de su uso.

A partir de los animales más grandes cuyos datos de CBC indicaban que se toleraría bien, se recogió una muestra adicional para recolección de células después de la sensibilización, pero antes del refuerzo. Debido a que había 14 monos (dos grupos) que recibieron dos dosis de RTS,S/Adyuvante y 14 monos que recibieron una dosis única de

Ad35CS antes de la 8ª semana, se esperaba muestrear al menos la mitad y de ese modo mantener la significancia estadística. Las recolecciones de células ocurrirían no antes de 4 semanas después de una inyección. Debido a que los grupos que obtenían únicamente construcciones de adenovirus recibieron únicamente dos inyecciones y, por tanto, tienen un programa de toma de muestra de sangre menos exigente que los monos que recibían tres inyecciones, se esperaba que una recolección de células intermedia entre las dos inyecciones no representara dificultades.

Los análisis de las respuestas inmunes celulares incluían ensayos de ELISPOT a corto plazo para cuantificación de células productoras de IFN- γ específico de antígeno. El análisis citométrico de flujo de células estimuladas con antígeno puede no sólo confirmar los datos recogidos en análisis de ELISPOT, sino que proporciona información adicional acerca del fenotipo de las células específicas de antígeno que están respondiendo. Por tanto, la determinación del subconjunto que secreta IFN- γ CD8+ específico de antígeno mediante tinción intracelular y citometría de flujo también se investiga.

Los ensayos adicionales que se realizan incluyen análisis de ELISpot masivo para determinar citoquinas adicionales, tinción intracelular para enumeración de subgrupos de células T de citoquinas adicionales, otros ensayos basados en citometría de flujo para cuantificación de producción de citoquina de subconjunto de células T específicas de antígeno y RT-PCR cuantitativa para correlación con los otros procedimientos.

Los monos se dividieron en grupos igualados de edad, sexo, peso y origen geográfico y los grupos después se aleatorizaron. Todas las evaluaciones clínicas y las determinaciones de criterios de valoración de seguridad se determinaron sin el conocimiento de la asignación de grupos de los monos. De forma similar, todos los ensayos inmunológicos se realizaron sin conocimiento previo de los grupos a los cuales pertenecían las muestras individuales. La excepción a esta política ciega fueron los animales que recibieron inmunizaciones en un programa de 0 y 6 meses en lugar de 0, 1 y 3; sin embargo, la ceguera se mantuvo con respecto a la inyección específica que se estaba proporcionando.

Un tamaño de grupo de siete animales por grupo de ensayo (y cuatro en el grupo de control) es ideal para minimizar el tamaño del grupo pero para detectar de forma precisa diferencias entre grupos, en base a datos previos de experimentos similares, pero relacionados únicamente de forma distante.

Las medias geométricas de resultados de ensayos de ELISA se compararon paramétricamente usando análisis convencionales tales como la prueba t de Student, asumiendo varianza igual y dos colas y ANOVA. Los resultados de ensayos de ELISPOT, expresados en puntos por 200.000 células, se trataron de forma similar y también se examinaron usando análisis no paramétricos tales como el ensayo de Kruskal-Wallis. Cuando se requieren comparaciones intergrupo, la prueba de t de Student, sobre datos brutos o transformados por log, se usa para determinar las diferencias entre cualquier par de grupos.

Antes de la inyección, el pelo se cortó y la piel se limpió con alcohol para frotar al 70 % y se dibujó un círculo de 2,5-3 cm en la piel en tinta indeleble para facilitar el sitio de inyección para palpación posterior y evaluación de reactogenicidad. Las inyecciones de RTS,S se mezclaron con el adyuvante inmediatamente antes de entrar en el pasillo del mono. El volumen de inyección final fue de 0,5 ml y se administró a través de una aguja de calibre 25-29 en la musculatura anterior del muslo. Las construcciones de adenovirus se prepararon como se ha descrito (documento 2004/055187) en solución salina tamponada y también se administraron en el mismo emplazamiento intramuscular en un volumen final de 0,5 ml.

La muestra biológica primaria fue sangre, bien para suero o células. En la Tabla 1B se describe un programa de toma de muestras de sangre. El estado hematológico del animal se supervisó; que indica la capacidad de un individuo de mantener la muestra biológica repetida o que significa que el programa de muestra biológica planeado se debe reducir. Cada vez que se tomaba sangre, se realizaba un recuento de sangre completo (CBC) con un contador de células sanguíneo automatizado Coulter (que requiere < 50 μ l de sangre no coagulada). Se llevaron a cabo las directrices similares a GLP recomendadas por el fabricante para el mantenimiento y la conservación. Se realizó el seguimiento cercano del hematocrito, hemoglobina, volumen corpuscular medio (VCM), recuento de glóbulos rojos (RBC) y porcentaje de reticulocito para asegurar que los animales no se volvían anémicos.

La sangre venosa se recogió de las venas femoral, safena o cefálica usando agujas de calibre 20-24 y jeringas o tubos de vacío. En general, las venas safena o cefálica se prefirieron para extracciones de sangre de menos de 10 ml y las venas femorales se prefirieron para evitar la hemólisis y acortar el tiempo de venopunción total cuando se extraían volúmenes de más de 10 ml.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se recogieron de los animales antes de la inmunización, dos semanas después de la inmunización final y tres meses después de la inmunización final. En este protocolo, las PBMC se separan mediante procedimientos convencionales de centrifugación de densidad y se conservan congeladas en suero autólogo al 45 % (45 % de solución salina y 10 % de DMSO). En resumen, la sangre completa se estratificó en medio de separación de células ficoll-hypaque Lymphoprep® (Axis-Shield, Oslo, Noruega) y se centrifugó a 650 g durante 20 min. La capa de células se eliminó y se lavó en dos lavados de dPBS (BioWhittaker, Walkersville, MD) a 400 g durante 15 min. Las células viables se contaron usando un hemocitómetro Coulter

ACT*10. Los sedimentos se volvieron a suspender a 1×10^7 /ml en dPBS al 50 % y solución salina al 50 %. Se añadió DMSO gota a gota hasta un volumen final del 10 %. Las células se congelaron en alícuotas de 0,55 ml de exactamente 5 millones de células cada una colocándolas en un baño de isopropanol de reducción de temperatura controlada en el congelador a -70 °C durante una noche y se almacenó en nitrógeno líquido en fase de vapor hasta su uso.

Después de la última vacunación, las células T que secretan interferón gamma (IFN- γ) en muestras sanguíneas de los diferentes monos se identificaron con el ensayo inmunospot ligado a enzima (ELISpot) después de estimulación con antígenos completos y combinaciones de péptidos específicos C y N-terminal (como se ha descrito con detalle más adelante). Los resultados se representan en la figura 1 (2 semanas después de la última vacunación) y la figura 2 (3 meses después de la última vacunación) y se expresan en la tabla 2 y 4, respectivamente, como mediana de unidades formadoras de puntos por millón de células (SFU); la comparación estadística se realizó usando análisis de varianza (ANOVA) en datos transformados con log. Todos los grupos se compararon. En caso de que se determinara la significancia estadística y se puede realizar un análisis post-hoc para una comparación grupo por grupo (resultados no mostrados).

Para comparar los resultados de ELISpot entre diferentes estrategias de tratamiento, las proporciones de títulos de media geo se calcularon para estrategias con Ad35 como tratamiento de sensibilización. En estas proporciones el título de media geo obtenido con el tratamiento con RTS,S en solitario (a los 0, 2, 3 meses) se tomó como tratamiento de referencia (figura 5 y 6 y tabla 10). De forma similar, también se calcularon las proporciones para estrategias con AD35 como tratamiento de refuerzo (figura 7 y 8 y tabla 11).

Se realizaron análisis similares para los resultados de ELISpots de células T de estimulación específica de extremo N. Los resultados se representan en las figuras 9 y 10 y en las tablas 12 y 14, respectivamente. Finalmente, las proporciones se calcularon y presentaron en la figura 11 (estrategia de sensibilización de Ad35) y la figura 12 (estrategias de refuerzo de Ad35) y las tablas 16 y 17, respectivamente.

Se realizaron ELISpots en PBMC conservadas en congelación descongeladas en placas de ELISpot MultiScreen-IP de fondo PVDF (Millipore, Bedford, MA) usando metodología convencional. La técnica estéril se adhirió estrictamente hasta que las células se eliminaron el día 2 para un desarrollo de punto final.

Medios usados: medio completo (cRPMI) se preparó recientemente a partir de RPMI-1640 (BioWhittaker, Walkersville, MD) con la adición de 1:100 penicilina/estreptomicina, 1:100 L-glutamina, 1:200 NaHCO₃ (Sigma, St. Louis, MO), 1:100 aminoácidos no esenciales, 1:100 Piruvato y 1:300 2-ME (Gibco). Suero fetal bovino (FCS, HyClone, Logan, UT), de un lote caracterizado previamente mediante un ensayo de proliferación inespecífico para soportar un buen crecimiento de células de mono y proporcionar poco fondo estimulador, se añadió a un volumen final del 10 % para cRPMI-10, el 20 % para cRPMI-20, etc. Media-Plus (M+) se complementa adicionalmente con anticuerpos anti-CD28 de mono y anti-CD49D de mono a 1:500 (BD Pharmingen, San Jose, CA).

Los siguientes estimulantes se prepararon recientemente a dos veces la concentración final pretendida en M+ sin suero añadido:

Con A: Concanavalina A (Sigma) a 2,5 μ g/ml (1,25 μ g/ml final) como un control positivo de todos los viales.

CS-C: una combinación de polipéptidos de 15 unidades, con solapamiento por 11 aminoácidos, que cubren la parte C-terminal de la molécula de PfCS (suministrado por GSK, Rixensart, Bélgica) a 2,5 μ g/ml de cada péptido (1,35 μ g/ml final).

CS-N: una combinación similar de péptidos de 15 unidades, con solapamiento por 11, que cubre el extremo N de la molécula de PfCS.

RTS,S: antígeno RTS,S de complejo de proteína completa purificada adecuado para cultivo celular (GSK) a 2 μ g/ml (1 μ g/ml final).

HEF: proteína completa de antígeno de superficie de Hepatitis B purificada (HbS) (el componente "S" de RTS,S), también adecuada para cultivo celular (GSK) a 23,2 μ g/ml (11,6 μ g/ml final).

HbS-P: una combinación péptidos de 15 unidades de HbS (GSK) a 2,5 μ g/ml cada péptido (1,25 μ g/ml final).

El control negativo fue M+ sin complementación adicional.

Las placas se prepararon de la manera siguiente. Las placas se revistieron con 50 μ l/pocillo de una dilución 1:100 en dPBS estéril del anticuerpo primario monoclonal anti-IFN- γ de mono (UcyTech n° 21-43-09, Utrecht, Países Bajos), y se incubó en una bolsa de plástico a 4 °C durante 5-6 h. 1 h antes del uso, el anticuerpo de revestimiento se eliminó y la placa se bloqueó con cRPMI-10 en una incubadora de cultivo celular de humedad controlada a 37 °C, CO₂ al 5 %. Inmediatamente antes del uso, el medio de bloqueo se eliminó.

Descongelamiento de PBMC conservado en frío: los viales congelados se sometieron a agitación vorticial en agua

corriente tibia (37-40 °C) hasta que estaban casi descongelados y el contenido de 0,55 ml se transfirió inmediatamente a 8 ml de RPMI-20. Las células se lavaron a 350 g durante 13 min y el sedimento se resuspendió cuidadosamente en 2,0 ml de cRPMI-20. Una alícuota de 40 µl estéril después se retiró para confirmar los números de células viables y el volumen se ajustó según fuera necesario para producir una suspensión de células únicas de 2×10^6 células/ml.

Pre-estimulación: volúmenes iguales de suspensión celular en cRPMI-20 y estimulantes en M+ se mezclaron en tubos de polipropileno de cultivo de células para proporcionar la concentración deseada final de todos los reactivos. Después las células se almacenaron en la incubadora durante al menos 5 h, con tapas flojas y en una posición inclinada para facilitar el intercambio de gas.

Estimulación final: después de 5-6 h de incubación, las células se centrifugaron a 400 g durante 10 min y los sobrenadantes se descartaron. Después las células se resuspendieron nuevamente inmediatamente en mitad cRPMI-20 y mitad estimulante. Las mismas se devolvieron a la incubadora durante 10-20 min para permitir la estabilización de pH. Después, las células se mezclaron brevemente y 200 µl (200.000 células) se pipetearon cuidadosamente en los pocillos apropiados en las placas bloqueadas y vaciadas. Se tuvo cuidado en todas las etapas de asegurar que los pocillos no se secaran. Las placas después se incubaron sin alterarse durante una noche (> 16 h).

Desarrollo de puntos: una dilución 1:100 de anticuerpo secundario policlonal anti-IFN-γ de mono (UcyTech) se preparó en dPBS con FCS al 2 %. Las células y el medio se extrajeron de la placa; los pocillos se lavaron 8 veces con dPBS-Tween 20 al 0,5 % (Sigma) y se cargaron con 50 µl del anticuerpo secundario diluido. Las placas se lavaron nuevamente 8 veces con dPBS-Tween 20 al 0,5 % y se cargaron con 50 µl/pocillo de una dilución 1:1000 de conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina (Southern Biotech n° 7100-04, Birmingham, AL). Las placas después se incubaron durante 2 h adicionales a temperatura ambiente en una bolsa de plástico en el panel en balanceo. Finalmente, las placas se lavaron 8 veces como anteriormente, seguido por un lavado único con agua destilada y adición de 100 µl/pocillo de sustrato cromogénico NBT-BCIP (Pierce Biotech, Rockford, IL). Se permitió que el color se desarrollara durante 10-20 min, hasta que el fondo estuvo oscuro. Después las placas se enjuagaron con al menos dos lavados de 300 µl de agua destilada y se secaron al aire durante una noche antes de la lectura.

Lectura de placa: las placas se leyeron en un lector AID ELHR01 Elispot usando AID ELISpot Reader v3.1.1. Todos los pocillos se examinaron visualmente y los recuentos de puntos inapropiados (pelusas u otros restos) se excluyeron manualmente. Los datos se guardaron en una hoja de cálculo de Excel. Los pocillos duplicados o triplicados se promediaron y este número se multiplicó por 5 para producir los datos brutos finales en puntos/millón de células.

Control de calidad: La recuperación de células viables promedio después de congelación/descongelación superó el 95 %. Los desarrollos se repitieron si los pocillos de control con medio promediaban más de 20 puntos/millón o si los pocillos de ConA tenían menos de 500 puntos/millón. También, en conjunto, la viabilidad de CD4+ y CD8+, evaluada usando citometría de flujo con tinción de exclusión 7-ADD y tinción de superficie, todos tuvieron que exceder el 90 % o el desarrollo se repetía (datos no incluidos).

Tabla 1A. Régimen experimental para el régimen de sensibilización/refuerzo en macacos Rhesus usando vectores adenovirales recombinantes en base a serotipo 5 y 35 que comprende el gen que codifica la proteína CS de *P. falciparum* y la RTS,S potenciada con adyuvante como el componente de antígeno proteináceo

Grupo	Sensibilización	Mes 1	Mes 3	Mes 6
1	RTS,S	RTS,S	RTS,S	
2	RTS,S	RTS,S	Ad35-CS	
3	Ad35-CS	RTS,S	RTS,S	
4	Ad35-CS		Ad35-CS	
5	Ad35-CS			Ad35-CS
6	Ad5-CS			Ad35-CS
7	Ad35-vacío		Ad35-vacío	

ES 2 371 175 T3

Tabla 1B. Programa de recolección de sangre. Las recolecciones de CBC y células requieren sangre completa; la química y el ELISA requieren suero. Se asume que 1 ml de suero representa 2 ml de sangre completa. Únicamente se indican los volúmenes de sangre completa. Los intervalos indican dónde se pueden recoger muestras más grandes a partir de monos más grandes. "0,5" en la columna de CBC/quím indica que únicamente se realizó CBC en esos días. * Indica que no se tomaron muestras de sangre de todos los monos en este punto de tiempo

5

Semana-Día	CBC/quím	ELISA	Células	Sangre Completa TOTAL (ml)
Semana -4 (aprox.)	1-3	2,5-5	25-35	28-43
Semana-1*	1-3	2,5-5		3,5-8
Semana0-Día0	1-3	2,5-5		3,5-8
0-1	1-3	2,5		3,5-5,5
0-2	1-3			1-3
0-3	1-3			1-3
1	1-3	2,5-5		3,5-8
2	1-3	2,5-5		3,5-8
4-0	1-3	2,5-5		3,5-8
4-1	1-3	2,5		3,5-5
4-2	1-3			1-3
4-3	1-3			1-3
5	1-3	2,5-5		3,5-8
6	1-3	2,5-5		3,5-8
8	0,5	2,5-5	15-35*	18-40
10	0,5	2,5-5		3-5,5
12-0	1-3	2,5-5		3,5-8
12-1	1-3	2,5		3,5-5,5
12-2	1-3			1-3
12-3	1-3			1-3
13	1-3	2,5-5		3,5-8
14	1-3	2,5-5		3,5-8
15	2,5			2,5
16	1-3	2,5-5	25-35	28-43
18	0,5	2,5-5		3-5,5
20	0,5	2,5-5		3-5,5
22	0,5	2,5-5		3-5,5
25-0	1-3	2,5-5		3-7,5
25-1*	1-5			1-5
25-2*	1-5			1-5

(cont)

Semana-Día	CBC/quím	ELISA	Células	Sangre Completa TOTAL (ml)
25-3*	1-5			1-5
26	2,5-7,5			1-5
27	0,5	2,5-5	25-35	28-43
28	2,5			2,5
29	0,5	5		5,5
31	0,5	5		5,5
33	0,5	5		5,5
35	0,5	5		5,5
38	0,5	5	25-35*	5,5-43
39	0,5	7		7,5
40*		5-10*	20-35*	25-43*
41*	0,5*	7*		7,5*
44*	0,5*	2,5-5*		3-5,5*
48*	0,5*	5*		5,5*
51*	0,5*	5-10*	25-35*	28-43*
52*	0,5*	5*		5,5*

En las tablas más adelante, RTS,S se denomina simplemente "RTS".

5 Tabla 2. Inmunidad de células T específica de PfCS C-terminal dos semanas después de refuerzo: comparación de ELISpot (en SFU/millones de células) y ANOVA de mediana y media geométrica. Se proporcionan diferentes regímenes de sensibilización/refuerzo (izquierda).

	2 semanas después de refuerzo	
	Mediana	Media geo
RTS,RTS,RTS	20	31
RTS,RTS,Ad35	233	166
Ad35,RTS,RTS	571	553
Ad35,Ad35 (3 meses)	85	78
Ad35,Ad35 (6 meses)	47	42
Ad5,Ad35 (6 meses)	110	89
Ad35 vacío	2	2
ANOVA		P<0,0001

Tabla 3. Prueba T de Student. Valores p para comparación de ELISpot de IFN- γ específico de PfCS C-terminal, como se muestra en la Tabla 2, dos semanas después de refuerzo (última vacunación).

	RTS,RTS, RTS	RTS,RTS, Ad35	Ad35,RTS, RTS		Ad35,Ad35 3 meses	Ad35,Ad35 6 meses
RTS,RTS, RTS						
RTS, RTS, Ad35	0,05					
Ad35,RTS, RTS	0,008	0,03				
Ad35,Ad35 3 meses	0,24	0,20	0,001			
Ad35, Ad35 6 meses	0,70	0,015	<0,0001		0,19	
Ad5, Ad3 6 meses	0,16	0,24	0,0004		0,80	0,07

5 Tabla 4. Inmunidad de células T de IFN- γ específico de C-terminal tres meses después de refuerzo: comparación de ELISpot (en SFU/millón de células) y ANOVA de la mediana y la media geométrica. Se proporcionan diferentes regímenes de sensibilización/refuerzo (izquierda).

	3 meses después del refuerzo	
	Mediana	media geo
RTS,RTS,RTS	8	9
RTS,RTS,Ad35	35	49
Ad35,RTS,RTS	128	156
Ad35,Ad35 (3 meses)	25	25
Ad35,Ad35 (6 meses)	15	15
Ad5,Ad35 (6 meses)	77	81
Ad35 vacío	2	2
ANOVA		P<0,0001

ES 2 371 175 T3

Tabla 5. Prueba T de Student. Valores p para comparación de ELISpot, como se muestra en la Tabla 4, tres meses después de refuerzo (última vacunación).

	RTS,RTS, RTS	RTS,RTS, Ad35	Ad35,RTS, RTS		Ad35,Ad35 3 meses	Ad35, Ad35 6 meses
RTS,RTS, RTS						
RTS,RTS, Ad35	0,03					
Ad35,RTS, RTS	0,003	0,03				
Ad35,Ad35 3 meses	0,15	0,26	0,0009			
Ad35, Ad35 6 meses	0,48	0,07	0,0009		0,36	
Ad5, Ad35 6 meses	0,006	0,38	0,12		0,04	0,009

5 Tabla 6. Inmunidad de células B (título de anticuerpo anti-repetición) dos semanas después de refuerzo final: comparación de título de ELISA y ANOVA de mediana y media geométrica. Se proporcionan regímenes diferentes de sensibilización/refuerzo (izquierda).

	2 semanas después de refuerzo	
	Mediana	media geo
RTS,RTS,RTS	3313	3385
RTS,RTS,Ad35	3705	3400
Ad35,RTS,RTS	1737	2059
Ad35,Ad35 (3 meses)	295	336
Ad35,Ad35 (6 meses)	161	171
Ad5,Ad35 (6 meses)	339	347
Ad35 vacío	1	1
ANOVA		P<0,0001

ES 2 371 175 T3

Tabla 7. Prueba T de Student. Valores p para comparación de anticuerpo, como se muestra en la Tabla 6, dos semanas después de refuerzo final (última vacunación)

	RTS,RTS, RTS	RTS,RTS, Ad35	Ad35,RTS, RTS		Ad35, Ad35 3 meses	Ad35, Ad35 meses
RTS,RTS, RTS						
RTS,RTS, Ad35	0,99					
Ad35,RTS, RTS	0,07	0,10				
Ad35, Ad35 3 meses	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001			
Ad35,Ad35 6 meses	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001		0,06	
Ad5,Ad35 6 meses	< 0,0001	< 0,0001	0,0002		0,93	0,086

5 Tabla 8. Inmunidad de células B (título de anticuerpo) tres meses después de refuerzo relacionada con CS de *P. falciparum*: comparación de ELISA (en SFU) y ANOVA de mediana y media geométrica. Se proporcionan diferentes regímenes de sensibilización/refuerzo (izquierda).

	3 meses después de refuerzo	
	Mediana	Media geo
RTS,RTS,RTS	528	521
RTS,RTS,Ad35	487	357
Ad35,RTS,RTS	288	275
Ad35,Ad35 (3 meses)	67	78
Ad35,Ad35 (6 meses)	70	65
Ad5,Ad35 (6 meses)	92	141
Ad35 vacío	0	1
ANOVA		P<0,0001

Tabla 9. Prueba T de Student. Valores p para comparación de anticuerpo, como se muestra en la Tabla 8, tres meses después de refuerzo (última vacunación).

	RTS,RTS, RTS	RTS,RTS, Ad35	Ad35,RTS, RTS		Ad35,Ad35	Ad35,Ad35
RTS, RTS, RTS						
RTS, RTS, Ad35	0,40					
Ad35, RTS, RTS	0,12	0,59				
Ad35, Ad35 3 meses	< 0,0001	0,005	0,002			
Ad35, Ad35 6 meses	< 0,0001	0,003	0,002		0,32	
Ad5, Ad35 6 meses	0,01	0,088			0,15	0,067

5

Tabla 10. Proporción* de medias geométricas. Respuestas de células T y B. Ad35 usado como vacuna de sensibilización.

	Respuesta de células T		Respuesta de células B	
	Proporción* (int conf 95 %) 2 semanas	Proporción* (int conf 95 %) 3 meses	Proporción* (int conf 95 %) 2 semanas	Proporción* (int conf 95 %) 3 meses
Ad35,RTS,RTS	17,7 (4,4-72,1)	17,8 (5,1-61,9)	0,61 (0,35-0,85)	0,53 (0,23-1,22)
Ad35,Ad35 (3 meses)	2,5 (0,5-12,9)	2,9 (0,7-12,5)	0,10 (0,05-0,18)	0,15 (0,08-0,28)
Ad35,Ad35 (6 meses)	1,3 (0,3-6,0)	1,7 (0,4-7,9)	0,05 (0,03-0,10)	0,12 (0,07-0,22)

* RTS,RTS,RTS como referencia

Tabla 11. Proporción* de medias geométricas. Respuestas de células T y B. Ad35 usado como una vacuna de refuerzo.

	células T	respuesta	células B	respuesta
	Proporción* (int conf 95 %) 2 semanas	Proporción* (int conf 95 %) 3 meses	Proporción* (int conf 95 %) 2 semanas	Proporción* (int conf 95 %) 3 meses
RTS,RTS,Ad35	5,3 (1,0-29,0)	5,6 (1,2-26,1)	1,00 (0,54-1,87)	0,69 (0,27-1,77)
Ad5,Ad35 (6 meses)	2,8 (0,6-13,2)	9,2 (2,2-39,0)	0,10 (0,05-0,22)	0,27 (0,11-0,68)

* RTS,RTS,RTS como referencia

Tabla 12. Inmunidad de células T de IFN- γ específicas de PfCS N-terminal dos semanas después de vacunación final: comparación de ELISpot (en SFU/millón de células) y ANOVA de mediana y media geométrica. Se proporcionan diferentes regímenes de sensibilización/refuerzo (izquierda).

	2 semanas después de refuerzo	
	Mediana	media geo
RTS,RTS,RTS	5	4
RTS,RTS,Ad35	17	11
Ad35,RTS,RTS	130	126
Ad35,Ad35 (3 meses)	68	78
Ad35,Ad35 (6 meses)	108	69
Ad5,Ad35 (6 meses)	68	72
Ad35 vacío	1	2
ANOVA		P<0,0001

5

Tabla 13. Prueba T de Student. Valores p para comparación de ELISpot, como se muestra en la Tabla 12, dos semanas después de refuerzo final (última vacunación).

	RTS,RTS, RTS	RTS,RTS, Ad35	Ad35,RTS, RTS		Ad35,Ad35 3 meses	Ad35, Ad35 6 meses
RTS, RTS, RTS						
RTS, RTS, Ad35	0,12					
Ad35,RTS, RTS	< 0,0001	0,002				
Ad35, Ad35 3 meses	0,0002	0,012	0,39			
Ad35, Ad35 6 meses	< 0,0001	0,011	0,23		0,84	
Ad5, Ad35 6 meses	< 0,0001	0,007	0,22		0,88	0,94

10

Tabla 14. Inmunidad de células T de IFN- γ específicas de PfCS N-terminal tres meses después de refuerzo: comparación de ELISpot (en SFU/millón de células) y ANOVA de mediana y media geométrica. Se proporcionan diferentes regímenes de sensibilización/refuerzo (izquierda).

	3 meses después de refuerzo	
	Mediana	media geo
RTS,RTS,RTS	3	2
RTS,RTS,Ad35	12	10

(cont)

	3 meses después de refuerzo	
	Mediana	media geo
Ad35,RTS,RTS	32	40
Ad35,Ad35 (3 meses)	25	32
Ad35,Ad35 (6 meses)	30	17
Ad5,Ad35 (6 meses)	63	55
Ad35 vacío	3	2
ANOVA		P<0,0001

Tabla 15. Prueba T de Student. Valores p para comparación de ELISpot, como se muestra en la Tabla 14, tres meses después de refuerzo (última vacunación).

	RTS,RTS, RTS	RTS,RTS, Ad35	Ad35,RTS, RTS		Ad35,Ad35 3 meses	Ad35, Ad35 6 meses
RTS, RTS, RTS						
RTS, RTS, Ad35	0,035					
Ad35,RTS, RTS	0,0005	0,066				
Ad35, Ad35 3 meses	0,0005	0,10	0,73			
Ad35, Ad35 6 meses	0,011	0,48	0,27		0,39	
Ad5, Ad35 6 meses	< 0,0001	0,01	0,58			

5

Tabla 16. Proporción* de media geométrica de respuesta de células T frente al extremo N de PfCS. Ad35CS usado como una vacuna de sensibilización.

	respuesta de células T	
	Proporción* (int conf 95 %) 2 semanas	Proporción* (int conf 95 %) 3 meses
Ad35,RTS,RTS	32,4 (12,1-87,2)	16,5 (4,7-58,3)
Ad35,Ad35 (3 meses)	20,0 (6,1-66,0)	13,2 (4,1-42,3)
Ad35,Ad35 (6 meses)	17,9 (6,5-49,4)	7,1 (1,7-29,3)
* RTS,RTS,RTS como referencia		

Tabla 17. Proporción* de media geométrica de respuesta de células T frente al extremo N de CS. Ad35CS usado como vacuna de refuerzo.

	respuesta de células T	
	Proporción* (int conf 95 %) 2 semanas	Proporción* (int conf 95 %) 3 meses
RTS,RTS,Ad35	2,8 (0,7-10,9)	4,1 (1,1-15,2)
Ad5,Ad35 (6 meses)	18,5 (7,4-46,2)	22,4 (9,8-51,1)
* RTS,RTS,RTS como referencia		

REFERENCIAS

5 Bruña-Romero O y col. (2001) Complete, long-lasting protection against malaria of mice primed and boosted with two distinct viral vectors expressing the same plasmodial antigen. Proc Natl Acad Sci EE. UU. 98: 11491-11496
 Caspers P y col. (1989) The circumsporozoite protein gene from NF54, a Plasmodium falciparum isolate used in malaria vaccine trials. Mol Biochem Parasitol 35: 185-189
 Clyde D F y col. (1973) Immunization of men against sporozoite-induced malaria falciparum. Am J Med Sci 266: 169-177
 10 De Jong J C y col. (1999) Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. J Clin Microbiol 37: 3940-3945
 Doolan D L y col. (1998) DNA vaccination as an approach to malaria control: current status and strategies. Curr Topic Microbiol Immunol 226: 37-56
 15 Estcourt M J y col. (2002) Prime-boost immunization generates a high frequency, high-avidity CD8+ cytotoxic T lymphocyte population. Int Immunol 14: 31-37
 Gandon S y col. (2001) Imperfect vaccines and the evolution of pathogen virulence. Nature 414: 751-756
 Gordon D M y col. (1995) Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine. J Infect Dis 171: 1576-1585
 20 Hoffmann S L y Doolan D L. (2000) Malaria vaccines-targeting infected hepatocytes. Nature Med 6: 1218-1219
 Horn N A y col. (1995) Cancer Gene Therapy using plasmid DNA: purification of DNA for human clinical trials. Human Gene Therapy 6: 565-573
 Kester K E y col. (2001) RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. Efficacy of recombinant circumsporozoite protein vaccine regimens against experimental Plasmodium malaria falciparum. J Infect Dis 183: 640-647
 25 Kurtis J D y col. (2001) Pre-erythrocytic immunity to Plasmodium falciparum: the case for an LSA-1 vaccine. Trends in Parasitology 17: 219-223
 Lalvani A y col. (1999) Potent induction of focused Th1-type cellular and humoral immune responses by RTS,S/SBAS2, a recombinant Plasmodium malaria falciparum vaccine. J Infect dis 180: 1656-1664
 30 Lockyer M J y col. (1989) Wild isolates of Plasmodium falciparum show extensive polymorphism in T cell epitopes of the circumsporozoite protein. Mol Biochem Parasitol 37: 275-280
 Luke T C y Hoffman S L (2003) Rationale and plans for developing a non-replicating, metabolically active, radiationattenuated Plasmodium falciparum sporozoite vaccine. J Exp Biol 206: 3803-3808
 Nardin E H y col. (2001) A totally synthetic polyoxime malaria vaccine containing Plasmodium falciparum B cell and universal T cell epitopes elicits immune responses in volunteers of diverse HLA types. J Immunol 166: 481-489
 35 Mosmann T R y Coffman R L. (1989) TH1 And TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Ann Rev of Immunol 7: 145-173
 Musti A M y col. (1983) Transcriptional mapping of two yeast genes coding for glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase isolated by sequence homology with the chicken gene. Gene 25: 133-143
 40 Narum D L y col. (2001) Codon optimization of gene fragments encoding Plasmodium falciparum merzoite proteins enhances DNA vaccine protein expression and immunogenicity in mice. Infect and Immun 69: 7250-7253
 Nussenzweig R S y col. (1967) Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of Plasmodium berghei. Nature 216: 160-162
 Romero P y col. (1989) Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria. Nature 341: 323-326
 45 Stoute J A y col. (1997) A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against Plasmodium malaria falciparum. N Eng J Med 336: 86-91
 Stoute J A y col. (1998) Long-term efficacy and immune responses following immunization with the RTS,S malaria vaccine. J Infect Dis 178: 1139-1144
 50 Sun P F y col. (2003) Protective immunity induced with malaria vaccine, RTS,S, is linked to Plasmodium falciparum circumsporozoite protein-specific CD4(+) and CD8(+) T cells producing IFN-gamma. J Immunol 171: 6961-6967
 Valenzuela P y col. (1979) Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B virus surface antigen. Nature 280: 815-819

Vogels R y col. (2003) Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell interaction and bypass of pre-existing adenovirus immunity. *J Virol* 77: 8263

Wang R y col. (2001) Induction of CD4+ T cell-dependent CD8+ type 1 responses in humans by a malaria DNA vaccine. *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 98: 10817-10822

5 Zevering Y y col. (1994) Effect of polymorphis of sporozoite antigens on T-cell activation. *Res Immunol* 145: 469-476

REIVINDICACIONES

1. Un kit de partes que comprende:
- 5 - un adenovirus recombinante sin capacidad de replicación en un excipiente farmacéuticamente aceptable, comprendiendo dicho adenovirus un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de circumsporozoito (CS) que procede de un parásito que provoca la malaria; y
- un antígeno proteínico potenciado con adyuvante;
- en el que dicho adenovirus recombinante se selecciona entre el grupo que consiste en adenovirus humano de serotipo 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 y 50 y en el que dicho adenovirus recombinante sin capacidad de replicación es una composición de sensibilización y dicho antígeno proteínico potenciado con adyuvante es una composición de refuerzo.
- 10
2. Un kit de partes de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho adenovirus recombinante es adenovirus humano de serotipo 35.
3. Un kit de partes de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho antígeno proteínico comprende una proteína CS, o un fragmento inmunogénico de la misma, que procede de un parásito que provoca la malaria.
- 15
4. Un kit de partes de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho antígeno proteínico comprende una proteína híbrida de proteína CS o un fragmento inmunogénico de la misma fusionado al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), en forma de partículas de lipoproteína con HBsAg.
5. Un kit de partes de acuerdo con la reivindicación 4 en el que el antígeno proteínico comprende RTS,S.
- 20
6. Un kit de partes de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho antígeno proteínico está potenciado con adyuvante con un adyuvante que comprende QS21 y 3D-MPL.
7. Un kit de partes de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el adyuvante comprende además liposomas que contienen colesterol.
8. Un kit de partes de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicho parásito que provoca la malaria es *Plasmodium falciparum*.
- 25
9. Un kit de partes de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicho ácido nucleico heterólogo está optimizado con codón para aumentar la producción de la proteína codificada en un mamífero, preferentemente un ser humano.
10. Un kit de partes de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicho adenovirus recombinante está presente en una mezcla con un adyuvante.
- 30
11. Un kit de partes que comprende:
- un adenovirus de simio, canino o bovino recombinante sin capacidad de replicación en un excipiente farmacéuticamente aceptable, comprendiendo dicho adenovirus un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de circumsporozoito (CS) optimizado con codón y que procede de *Plasmodium falciparum*; y
- un antígeno proteínico potenciado con adyuvante que comprende RTS,S;
- 35
- en el que dicho adenovirus recombinante sin capacidad de replicación es una composición de sensibilización y dicho antígeno proteínico potenciado con adyuvante es una composición de refuerzo.
12. Un kit de partes de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho antígeno proteínico está potenciado con adyuvante con un adyuvante que comprende QS21 y 3D-MPL.
- 40
13. Un kit de partes de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el adyuvante comprende además liposomas que contienen colesterol.
14. Uso de un adenovirus recombinante sin capacidad de replicación que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno de CS, y que procede de un parásito que provoca la malaria, y de un antígeno proteínico potenciado con adyuvante en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la malaria, en el que dicho adenovirus recombinante es un adenovirus de simio, canino o bovino o un adenovirus humano de serotipo 11, 24, 26, 34, 35, 48, 49 ó 50 y en el que dicho adenovirus recombinante sin capacidad de replicación se usa como una composición de sensibilización y dicho antígeno proteínico potenciado con adyuvante se usa como una composición de refuerzo.
- 45
15. Uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicho antígeno proteínico comprende una proteína CS o un fragmento inmunogénico de la misma, que procede de un parásito que provoca la malaria.
- 50
16. Uso de acuerdo con la reivindicación 14 ó 15, en el que dicho parásito que provoca la malaria es *Plasmodium*

falci-parum.

17. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14-16, en el que dicho antígeno proteínico comprende una proteína híbrida de proteína CS o un fragmento inmunogénico de la misma fusionado al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), en forma de partículas de lipoproteína con HBsAg.
- 5 18. Uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicho antígeno proteínico potenciado con adyuvante comprende RTS,S.
19. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14-18, en el que dicho antígeno proteínico está potenciado con adyuvante con QS21 y 3D-MPL.
- 10 20. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14-19, en el que dicho ácido nucleico heterólogo está optimizado con codón para aumentar la producción de la proteína codificada en un mamífero, preferentemente un ser humano.

Fig.1

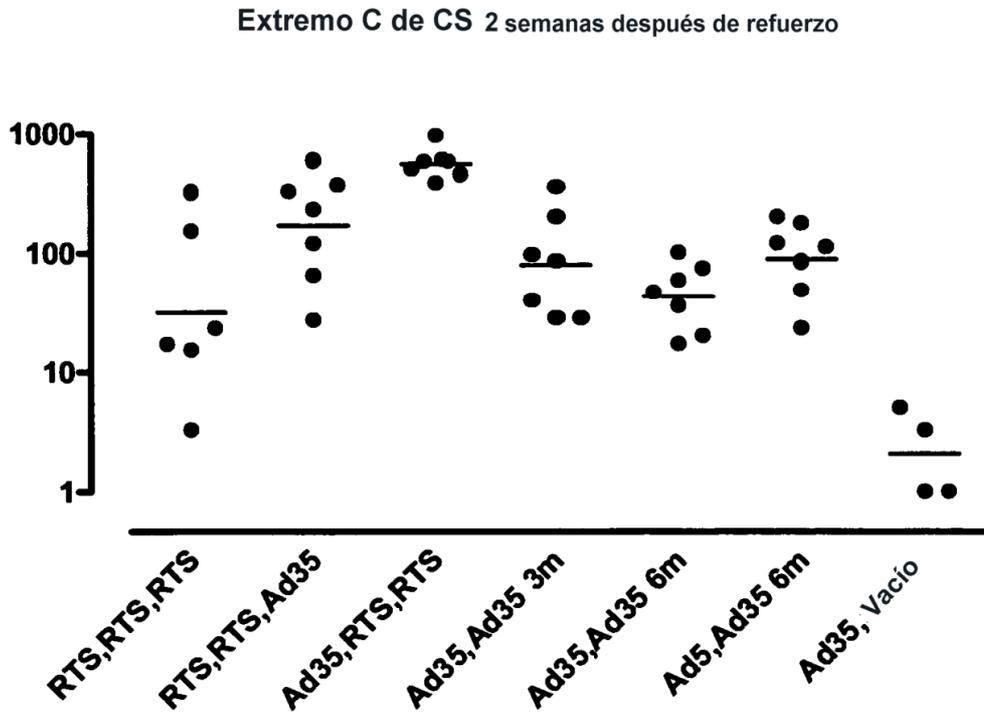


Fig. 2

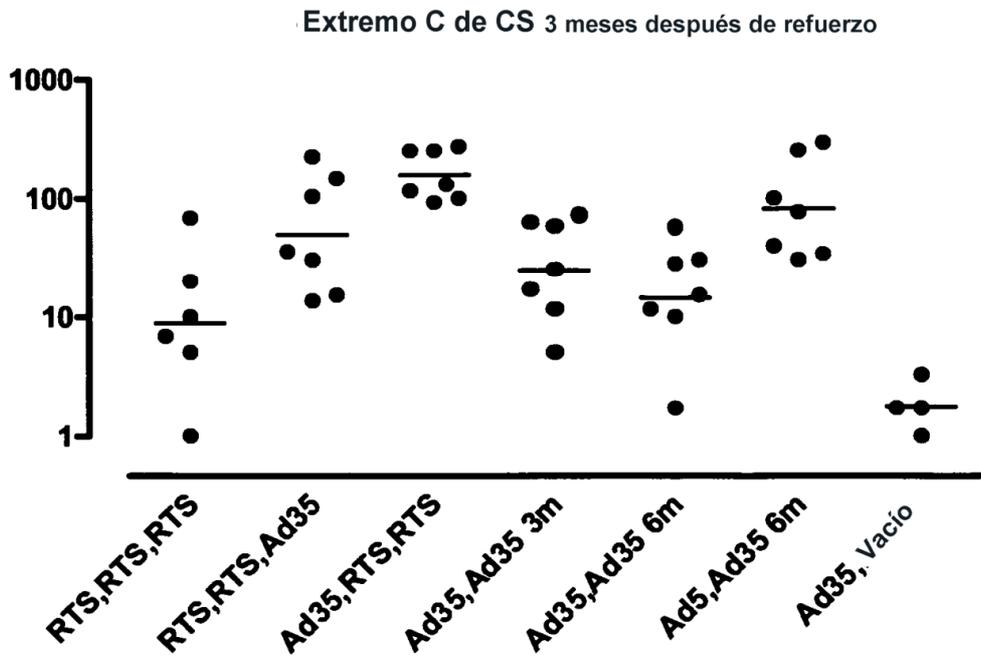


Fig. 3

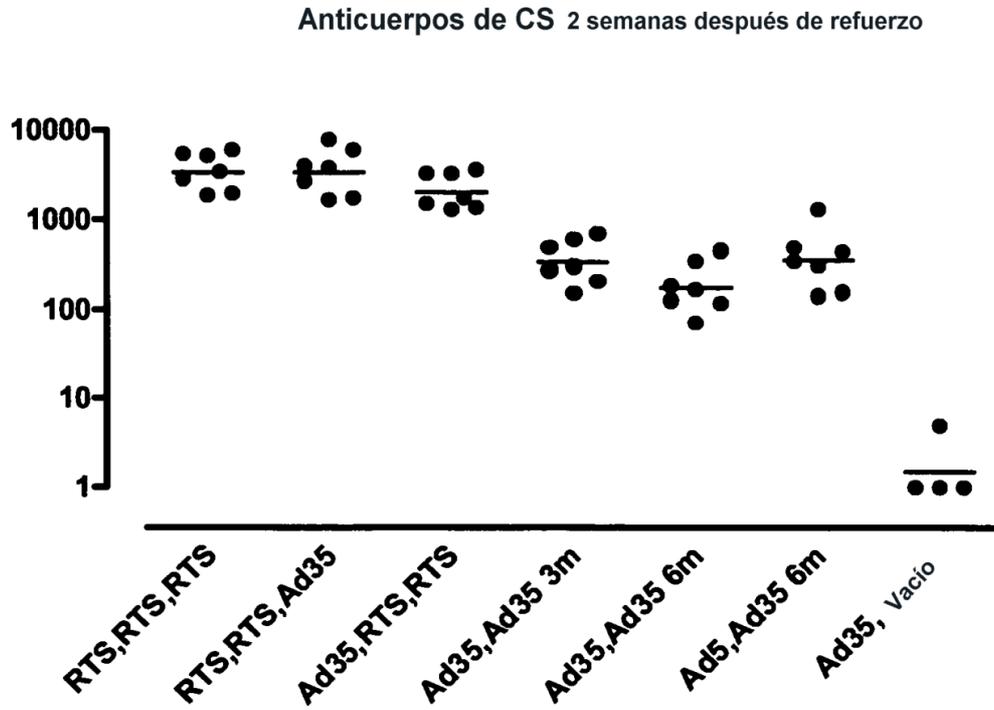


Fig. 4

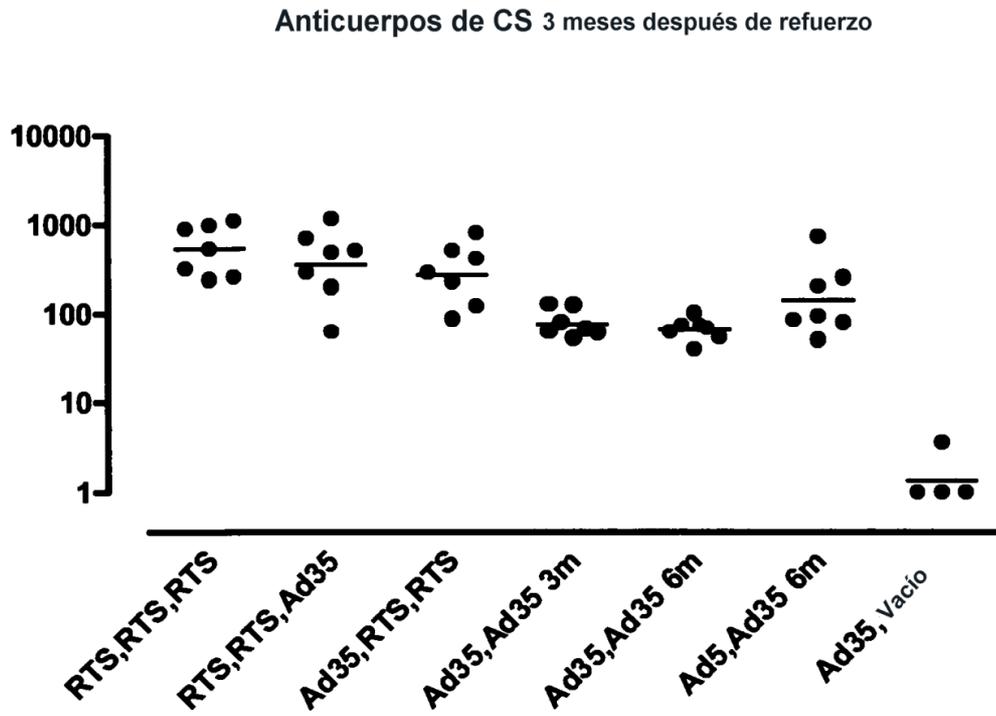


Fig. 5

Sensibilización con Ad35
respuesta de células T

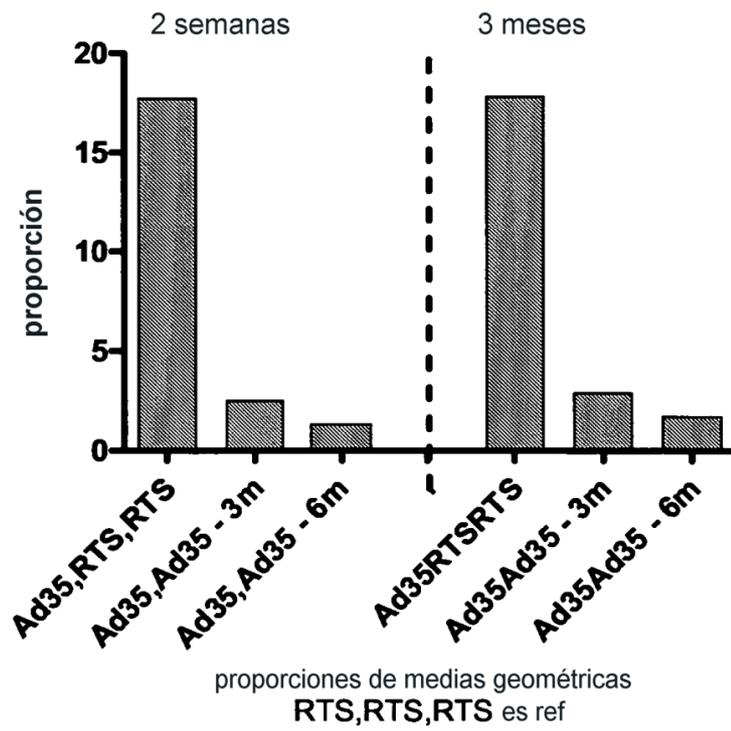


Fig. 6

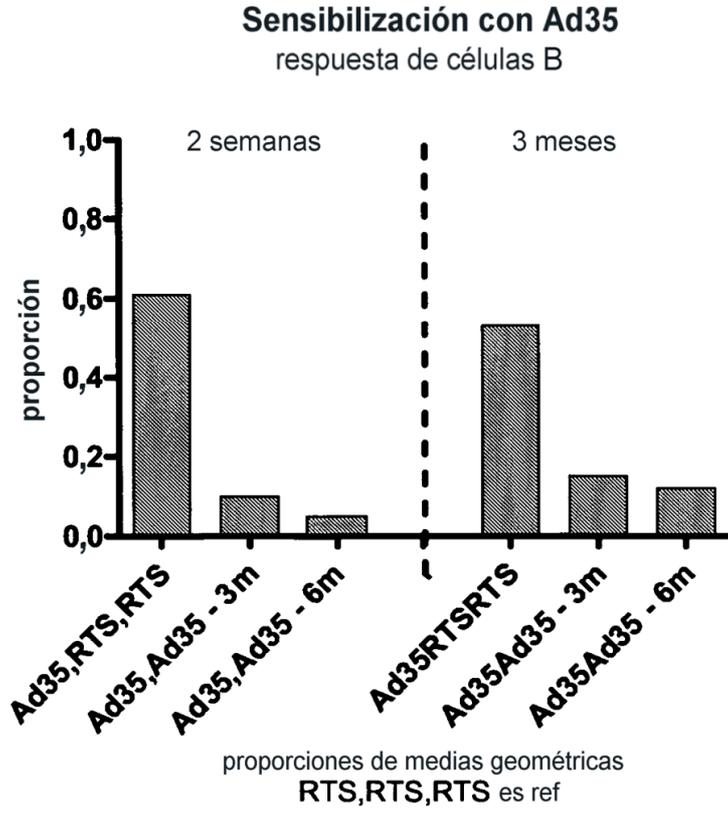


Fig. 7

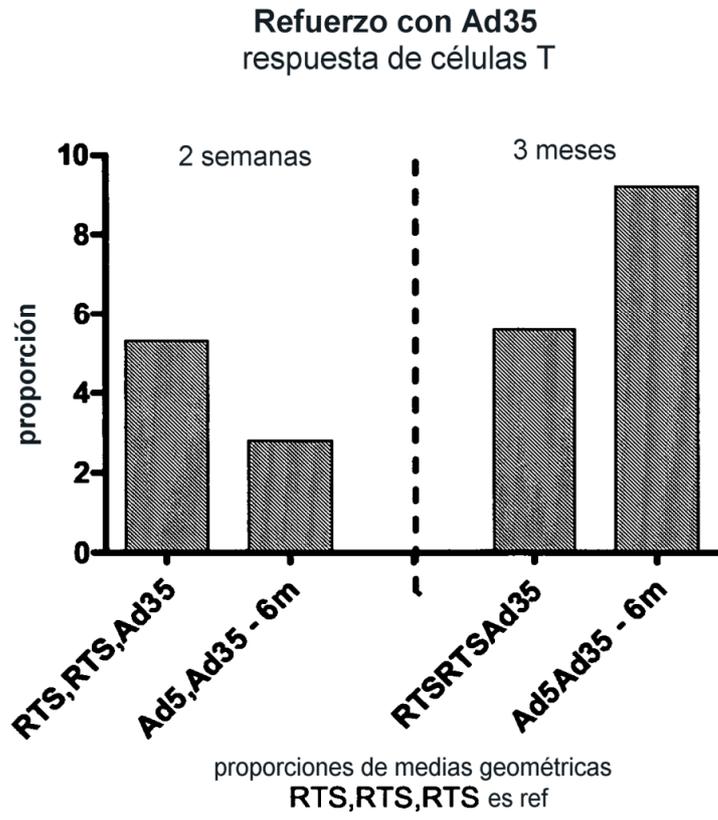


Fig. 8

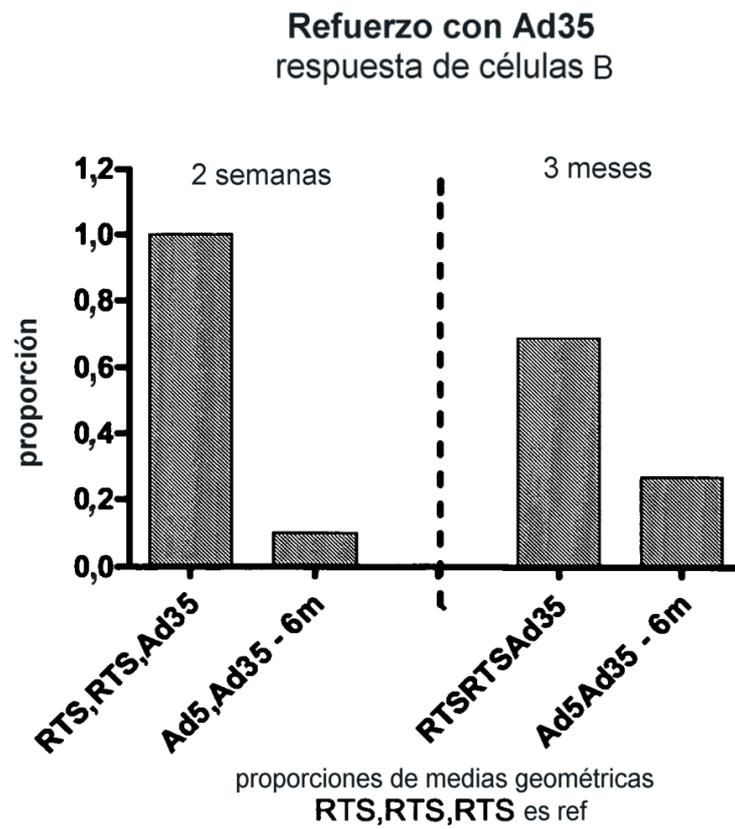


Fig. 9

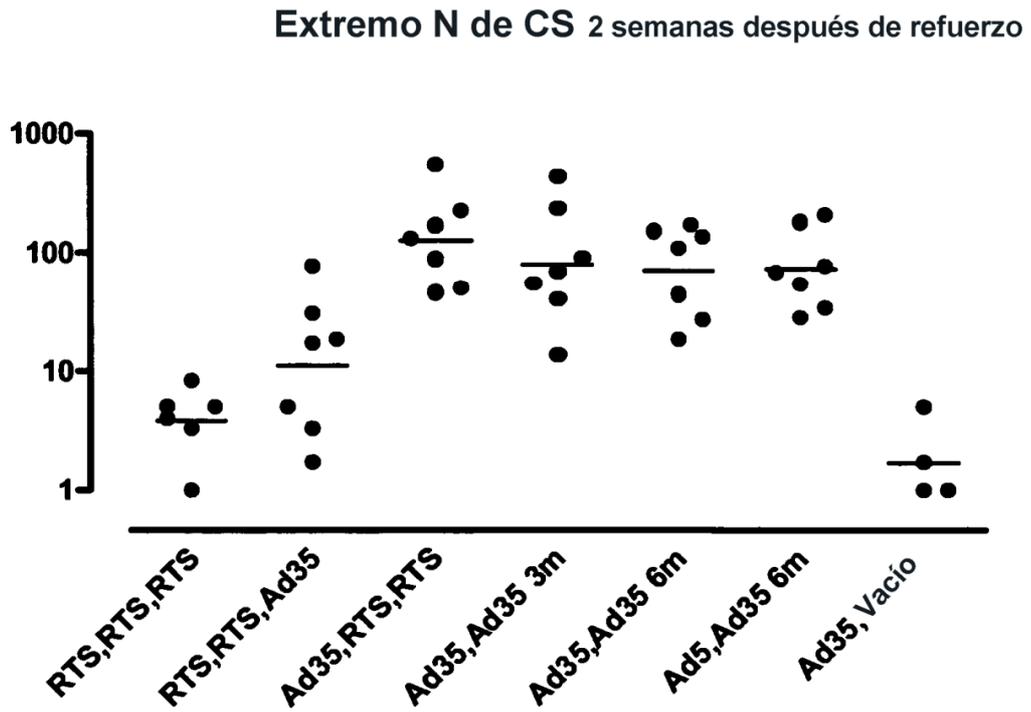


Fig. 10

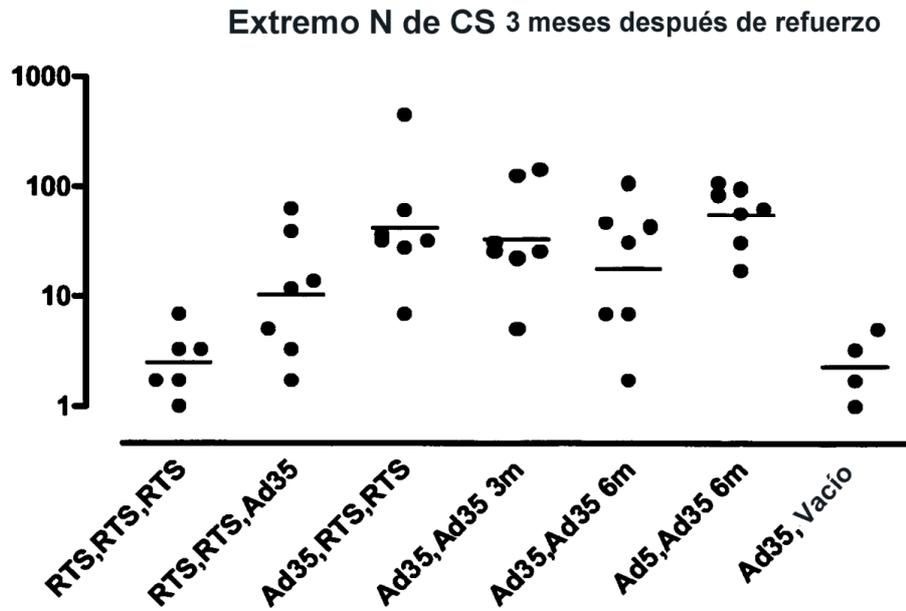


Fig. 11

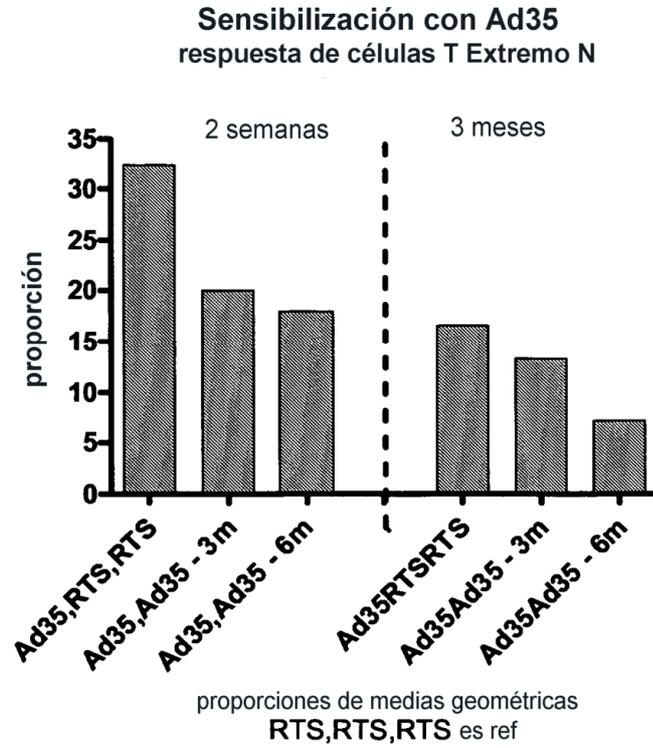


Fig. 12

