

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 964**

51 Int. Cl.:
C12N 15/30 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
A61K 39/015 (2006.01)
C07K 14/445 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03796103 .4**
96 Fecha de presentación: **16.12.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1573012**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2005**

54 Título: **Vacunas contra la malaria basadas en virus recombinante**

30 Prioridad:
17.12.2002 EP 02102781
12.06.2003 WO PCT/EP03/50222

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.04.2012

73 Titular/es:
CRUCCELL HOLLAND B.V.
ARCHIMEDESWEG 4
2333 CN LEIDEN, NL

72 Inventor/es:
PAU, Maria Grazia;
HOLTERMAN, Lennart;
KASPERS, Jorn y
STEGMANN, Antonius, Johannes, Hendrikus

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

ES 2 377 964 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas contra la malaria basadas en virus recombinante

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al campo de la medicina. Más en particular, la invención se refiere al uso de un vector viral producido de manera recombinante como vehículo de un determinante antigénico seleccionado de un grupo de patógenos de malaria para el desarrollo de una vacuna contra infecciones por malaria.

10

Antecedentes de la invención

La malaria representa actualmente una de las infecciones más prevalentes en áreas tropicales y subtropicales en todo el mundo. Al año, las infecciones por malaria conducen a dolencias graves en cientos de millones de individuos en todo el mundo, mientras que mata a de 1 a 3 millones de personas en países emergentes y en vías de desarrollo cada año. La existencia generalizada y la incidencia elevada de malaria son una consecuencia del número creciente de parásitos resistentes a fármacos y vectores de parásitos resistentes a insecticidas. Otros factores incluyen cambios climáticos y medioambientales, disturbios civiles y el aumento de la movilidad de las poblaciones. La malaria se produce por parásitos hematoprotzoarios transmitidos por mosquitos 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 hombre; muchas otras provocan la enfermedad en animales, tales como *P. yoelii* y *P. berghei* en ratones. *P. falciparum* representa la mayoría de infecciones y es del tipo más letal ("malaria tropical"). Los parásitos de la malaria tienen un ciclo de vida que consiste en varias fases. Cada una de estas fases puede inducir respuestas inmunitarias específicas dirigidas contra los antígenos específicos de fase que se producen de manera correspondiente. Los parásitos de la malaria se transmiten al hombre por varias especies de mosquitos *Anopheles* hembra. Los mosquitos infectados inyectan la forma de "esporozoito" del parásito de la malaria en el torrente sanguíneo del mamífero. Los esporozoítos permanecen durante algunos minutos en la circulación antes de invadir los hepatocitos. En esta fase, el parásito está ubicado en el entorno extracelular y está expuesto al ataque de anticuerpos, principalmente dirigidos a la proteína "circumsporozoito" (CS), un componente principal de la superficie del esporozoito. Una vez en el hígado, los parásitos se replican y se desarrollan en los denominados "esquizontes". Estos esquizontes se producen en una razón de hasta 20.000 por célula infectada. Durante esta fase intracelular del parásito, los principales responsables de la respuesta inmunitaria del huésped son los linfocitos T, especialmente los linfocitos T CD8+ (Romero *et al.* 1998). Tras aproximadamente una semana de la infección del hígado, se liberan miles de los denominados "merozoítos" en el torrente sanguíneo y entran en los glóbulos rojos, convirtiéndose en dianas de la respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos y citocinas segregadas por las células T. Tras invadir los eritrocitos, los merozoítos experimentan varias fases de replicación y se transforman en los denominados "trofozoítos" y en esquizontes y merozoítos, que pueden infectar nuevos glóbulos rojos. Esta fase está asociada con la enfermedad clínica manifiesta. Una cantidad limitada de trofozoítos puede evolucionar a "gametocitos", que es la fase sexual del parásito. Cuando los mosquitos susceptibles ingieren eritrocitos, se liberan los gametocitos de los eritrocitos, dando como resultado varios gametocitos machos y un gametocito hembra. La fertilización de estos gametos conduce a la formación del cigoto y a la transformación posterior en oocinetos, luego en ooquistes, y finalmente en esporozoítos de las glándulas salivales.

Dirigir anticuerpos contra antígenos de superficie específicos de la fase del gametocito puede bloquear este ciclo dentro de la parte media del intestino del mosquito. Tales anticuerpos no protegerán al huésped mamífero, pero reducirán la transmisión de malaria disminuyendo el número de mosquitos infectados y su carga parasitaria.

Los enfoques recientes con respecto al desarrollo de vacunas contra la malaria pueden clasificarse según las diferentes fases en las que puede existir el parásito, tal como se describió anteriormente. Pueden distinguirse tres tipos de vacunas posibles:

- Vacunas pre-eritrocíticas, que se dirigen contra las células infectadas con esquizontes y/o esporozoítos. Estos tipos de vacunas son en su mayor parte basadas en CS e idealmente deberían conferir inmunidad estéril, mediada por la respuesta inmunitaria celular y humoral, previniendo la infección por malaria.
- Vacunas contra la fase en sangre asexual, que se diseñan para minimizar la gravedad clínica. Estas vacunas deben reducir la morbilidad y mortalidad y pretenden prevenir la entrada y/o desarrollo del parásito en los eritrocitos.
- Vacunas que bloquean la transmisión, que se diseñan para dificultar el desarrollo del parásito en el mosquito huésped. Este tipo de vacuna debe favorecer la reducción de tasas de infección por malaria en la toda la población.

Junto a estas vacunas, se está buscando la viabilidad de desarrollar vacunas contra la malaria que seleccionen como diana múltiples fases del ciclo de vida del parásito en las denominadas vacunas de múltiples componentes y/o

múltiples fases. Actualmente, no se dispone comercialmente de vacunas contra la malaria, aunque el desarrollo de vacunas contra la malaria se ha iniciado ya hace más de 30 años: la inmunización de roedores, primates no humanos y seres humanos con esporozoítos atenuados con radiación confirió protección frente a una exposición posterior con esporozoítos (Nussenzweig *et al.* 1967; Clyde *et al.* 1973). Sin embargo, la falta de un sistema de cultivo a gran escala viable para la producción de esporozoítos evita la aplicación generalizada de tales vacunas.

Hasta la fecha, los candidatos de vacunas más prometedoras sometidas a prueba en seres humanos se han basado en un número pequeño de antígenos de superficie de esporozoítos. La proteína CS es el único antígeno de *P. falciparum* que se ha demostrado que evita sistemáticamente la malaria cuando se usa como la base de inmunización activa en seres humanos contra infecciones transmitidas por mosquitos, aunque a niveles que a menudo son insuficientes. El análisis teórico ha indicado que la cobertura de la vacuna así como la eficacia de la vacuna deben ser superiores al 85%, o en caso contrario pueden escapar mutantes que son más virulentos (Gandon *et al.* 2001).

Una manera de inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero es administrando un vehículo infeccioso, que alberga el determinante antigénico en su genoma. Un vehículo de este tipo es un adenovirus recombinante, que es de replicación defectuosa mediante la eliminación de regiones dentro del genoma que son normalmente esenciales para la replicación, tal como la región E1. Se conocen en la técnica ejemplos de adenovirus recombinantes que comprenden genes que codifican para antígenos (documento WO 96/39178), por ejemplo se ha demostrado que componentes antigénicos derivados del VIH proporcionan una respuesta inmunitaria si se administran mediante adenovirus recombinantes (documentos WO 01/02607; WO 02/22080). También para malaria, se han desarrollado vacunas basadas en adenovirus recombinantes. Estos vectores expresan la proteína CS entera de *P. yoelii*, que es un parásito específico de ratón y se ha demostrado que estos vectores pueden inducir inmunidad estéril en ratones, en respuesta a una única dosis de inmunización (Bruña-Romero *et al.* 2001a). Además, se demostró recientemente que un vector de vacuna similar usando el CS de *P. berghei* provoca protección duradera cuando se usa en un régimen de sensibilización y refuerzo, en combinación con un virus *Vaccinia* recombinante (Gilbert *et al.* 2002) en ratones. Se han descrito que los virus *Influenza* y *Vaccinia* recombinantes que expresan *P. falciparum* en seres humano provocan respuestas inmunitarias de CD8⁺ en ratones (Miyahira *et al.*, 1998). Se ha demostrado que las células T CD8⁺ ante todo median protección inducida por adenovirus. Es poco probable que los vectores de adenovirus basados en *P. yoelii* y *P. berghei* funcionen bien en seres humanos, puesto que las dolencias relacionadas con la malaria más graves en seres humanos no se producen por estos dos parásitos. Además, se prefiere tener una vacuna que sea lo suficientemente potente para generar protección duradera tras una ronda de vacunación, en lugar de múltiples rondas de vacunación usando o bien inyecciones de ADN desnudo y/o vacunas basadas en el virus *Vaccinia* como agentes de sensibilización o refuerzo. Se ha descrito la optimización de codones de una vacuna de ADN para *P. yoelii* (Nagata *et al.*, 1999).

A pesar de todos los esfuerzos para generar una vacuna que induzca una respuesta inmunitaria contra un determinante antigénico de malaria y que proteja de las dolencias producidas por el parásito de la malaria, muchas vacunas no cumplen todos los requisitos tal como se ha descrito anteriormente. Mientras que algunas vacunas no proporcionan una eficacia protectora de más del 85% en individuos vacunados, otras no actúan bien en áreas tales como la producción o administración a las células correctas del sistema inmunitario del huésped.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra el clon recién sintetizado 02-148 (pCR-script.Pf), que está basado en una variedad de genes de *Plasmodium falciparum* conocidos, y que codifica para la proteína circumsporozoíto (A) (SEQ ID NO:3), más la secuencia de ácido nucleico con codones optimizados (B) (SEQ ID NO:1). La SEQ ID NO:2 es el producto proteico traducido a partir de la secuencia codificante de SEQ ID NO:1 tal como se generó mediante PatentIn 3.1. La SEQ ID NO:2 es idéntica a SEQ ID NO:3 en contenido.

La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos (A) (SEQ ID NO:6) y la secuencia de ácido nucleico (B) (SEQ ID NO:4) del clon sintético denominado 02-659 (pf-aa-sub), que es el gen de circumsporozoíto de la cepa 3D7 de *P. falciparum*, que carece de los 14 aminoácidos del extremo C-terminal. La SEQ ID NO:5 es el producto proteico traducido a partir de la secuencia codificante de SEQ ID NO:4 tal como se generó mediante PatentIn 3.1. La SEQ ID NO:5 es idéntica a SEQ ID NO:6 en contenido.

La figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos (A) (SEQ ID NO:9) y la secuencia de ácido nucleico (B) (SEQ ID NO:7) del gen de circumsporozoíto con codones optimizados de *P. yoelii*. La SEQ ID NO:8 es el producto proteico traducido a partir de la secuencia codificante de SEQ ID NO:7 tal como se generó mediante PatentIn 3.1. La SEQ ID NO:8 es idéntica a SEQ ID NO:9 en contenido.

La figura 4 muestra (A) la respuesta inmunitaria celular y (B) la respuesta inmunitaria humoral en ratones tras la inmunización con vectores basados en Ad5 y Ad35 que albergan el gen de circumsporozoíto de *P. yoelii*, administrados mediante dos vías: intramuscular y subcutánea en diferentes dosis.

La figura 5 muestra la inhibición en ratones de una exposición a esporozoíto de *P. yoelii* tras la inmunización con

vectores basados en Ad5 y Ad35 que albergan el gen de circumsporozoíto de *P. yoelii*, administrados en diferentes dosis, representada en porcentaje de inhibición (A), y en presencia de moléculas de ARN específicas del parásito en el hígado (B).

- 5 La figura 6 muestra la respuesta inmunitaria celular generada por la inmunización con un vector basado en Ad5 que alberga el gen de circumsporozoíto de *P. falciparum* de longitud completa, y dos mutantes de delección, administrado en diferentes dosis.

Descripción de la invención

- 10 La presente invención se refiere a diferentes clases de vectores virales recombinantes de replicación defectuosa que comprenden un ácido nucleico heterólogo que codifica para un determinante antigénico de varios protozoarios *Plasmodium*. Se refiere a vectores virales que comprenden ácidos nucleicos que codifican para la proteína circumsporozoíto (CS) de *P. falciparum*. Dicho vector viral es un adenovirus, preferiblemente basado en un serotipo que es eficaz para administrar el gen de interés, que se encuentra con números bajos de anticuerpos neutralizantes en el huésped y que se une a las células inmunitarias relevantes de una manera eficaz. En una realización preferida, la proteína CS se genera de tal manera que dará lugar a una respuesta inmunitaria potente en mamíferos, preferiblemente en seres humanos. En un aspecto, la expresión de la proteína es elevada debido a la optimización de codones y alterando así la utilización de codones de tal manera que se ajuste al huésped de interés. La proteína CS para su uso en la presente invención se representa en la figura 2A (SEQ ID NO:6), mientras que los genes con codones optimizados que codifican para dichas proteínas se representan en la figura 2B (SEQ ID NO:4).

- 15 La invención también se refiere a composiciones de vacuna que comprenden un vector viral recombinante de replicación defectuosa según la invención, y a un vehículo farmacéuticamente aceptable, que comprende además preferiblemente un adyuvante.

Descripción detallada de la invención

- 20 La presente invención se refiere al uso de virus recombinantes tal como se define en las reivindicaciones como vehículos de ciertos determinantes antigénicos específicos seleccionados de un grupo de antígenos de malaria tal como se reivindica. El objetivo de la presente invención es proporcionar una solución a al menos una parte de los problemas señalados anteriormente para las vacunas contra la malaria ya existentes.

- 25 La presente invención se refiere a un vector viral recombinante de replicación defectuosa que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica para un determinante antigénico de *Plasmodium falciparum*. Dicho vector viral es un adenovirus, derivándose dicho adenovirus de un serotipo seleccionado del grupo que consiste en: Ad26 y Ad35. El vector viral recombinante de replicación defectuosa según la invención, es decir, tal como se reivindica, comprende un determinante antigénico que es la proteína circumsporozoíto (CS) tal como se representa en la figura 2A. Preferiblemente, dicho ácido nucleico heterólogo tiene codones optimizados para la expresión elevada en un mamífero, preferiblemente en un ser humano. La optimización de codones se basa en el contenido en aminoácidos requerido, en la utilización del codón óptimo general en el mamífero de interés y en varias previsiones de aspectos que deben evitarse para garantizar una expresión apropiada. Tales aspectos pueden ser sitios de donador y aceptor de corte y empalme, codones de parada, sitios Chi, tramos de poli(A), secuencias ricas en GC y AT, cajas de TATA internas, etcétera.

- 30 En una realización preferida, la invención se refiere a un vector viral recombinante de replicación defectuosa según la invención, en el que el contenido en adenina más timina en dicho ácido nucleico heterólogo, en comparación con el contenido en citosina más guanina, es inferior al 87%, preferiblemente inferior al 80%, más preferiblemente inferior al 59% y lo más preferiblemente igual a aproximadamente el 45%. La memoria descriptiva da a conocer un vector viral recombinante de replicación defectuosa, en el que dicha proteína circumsporozoíto es la proteína circumsporozoíto tal como se representa en la figura 1A y en otra realización, un ácido nucleico heterólogo con codones optimizados tal como se representa en la figura 1B. Las proteínas pueden expresarse *in vivo* a partir de vehículos de administración de ácido nucleico tales como los vectores virales recombinantes de la presente invención.

- 35 En otra realización, la invención se refiere a un vector viral recombinante de replicación defectuosa tal como se reivindica en el que la proteína circumsporozoíto de *P. falciparum* tal como se define en las reivindicaciones carece de una secuencia de anclaje GPI funcional.

- 40 Aparte del uso de nuevos genes y proteínas que pueden aplicarse para el uso en seres humanos, la presente memoria descriptiva también da a conocer genes novedosos que pueden usarse en seres humanos así como en otros mamíferos. Por tanto, la descripción también se refiere a un vector viral recombinante de replicación defectuosa que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica para la proteína circumsporozoíto de *Plasmodium yoelii*, teniendo dicho ácido nucleico codones optimizados para la expresión elevada en un mamífero.

- 45 Dicho vector viral es un adenovirus recombinante, que se selecciona del grupo que consiste en: Ad26 y Ad35. Como

en *P. falciparum* también se prefiere para *P. yoelii* usar un gen con codones optimizados para la expresión apropiada en el huésped de interés. El contenido en adenina más timina en dicho ácido nucleico, en comparación con el contenido en citosina más guanina, puede ser inferior al 87%, preferiblemente inferior al 80%, más preferiblemente inferior al 59% y lo más preferiblemente igual a aproximadamente el 45%.

La memoria descriptiva da a conocer un vector viral recombinante de replicación defectuosa según la invención, en el que dicha proteína circumsporozoíto es la proteína circumsporozoíto tal como se representa en la figura 3A, mientras que otro vector viral recombinante de replicación defectuosa comprende el ácido nucleico tal como se representa en la figura 3B. La proteína circumsporozoíto, o la parte inmunogénica de la misma, puede carecer de una secuencia de anclaje GPI funcional.

También se da a conocer un ácido nucleico aislado que codifica para una proteína circumsporozoíto de *Plasmodium falciparum* tal como se representa en la figura 1B, teniendo dicho ácido nucleico codones optimizados, y un ácido nucleico aislado que codifica para una proteína circumsporozoíto de *Plasmodium falciparum* cepa 3D7, tal como se representa en la figura 2B, teniendo dicho ácido nucleico codones optimizados. Tales ácidos nucleicos aislados pueden aplicarse en procedimientos de subclonación para la generación de vacunas basadas en virus, tal como se describe en el presente documento.

La producción puede ser en toda clase de sistemas, tales como bacterias, levaduras o células mamíferas conocidas en la técnica.

Se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica para una proteína circumsporozoíto de *Plasmodium yoelii* tal como se representa en la figura 3B, teniendo dicho ácido nucleico codones optimizados. Además, se proporciona una composición de vacuna que comprende un vector viral recombinante de replicación defectuosa tal como se reivindica y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se conocen bien en la técnica vehículos farmacéuticamente aceptables y se usan exhaustivamente en una amplia variedad de productos terapéuticos. Preferiblemente, se aplican vehículos que funcionan bien en vacunas. Más preferidas son las vacunas, que comprenden además un adyuvante. Se conoce en la técnica que los adyuvantes aumentan adicionalmente la respuesta inmunitaria a un determinante antigénico aplicado. La invención también se refiere a una composición de vacuna tal como se reivindica para su uso en el tratamiento terapéutico, profiláctico o diagnóstico de malaria.

La presente invención puede usarse en un método para tratar un mamífero de una infección por malaria o prevenir una infección por malaria en un mamífero, comprendiendo dicho método (en cualquier orden, o simultáneamente) las etapas de administrar una composición de vacuna según la invención, y administrar una composición de vacuna que comprende al menos una proteína o péptido purificado, derivado de malaria. La invención también puede usarse en un método para tratar un mamífero de una infección por malaria o prevenir una infección por malaria en un mamífero, comprendiendo dicho método (en cualquier orden, o simultáneamente) las etapas de administrar una composición de vacuna que comprende un vector viral recombinante de replicación defectuosa que comprende un antígeno del circumsporozoíto de malaria según la invención; y administrar una composición de vacuna que comprende un vector viral recombinante de replicación defectuosa tal como se reivindica que comprende otro antígeno, tal como LSA-1 o LSA-3 según la invención.

Las ventajas de la presente invención son múltiples. Junto con el conocimiento de que los virus recombinantes, tal como los adenovirus recombinantes, pueden producirse a títulos muy altos usando células que se consideran seguras, y que pueden hacerse crecer en suspensión a volúmenes muy altos, usando un medio que no contenga ningún componente derivado de animal o de ser humano, la presente invención combina estas características con un vector que albergan el gen de circumsporozoíto de *Plasmodium falciparum*. *P. falciparum* es el parásito que produce la malaria tropical. Además, el gen tiene codones optimizados para proporcionar un nivel de expresión que es adecuado para proporcionar una respuesta inmunitaria apropiada en seres humanos. La presente invención proporciona una vacuna contra las infecciones por malaria, haciendo uso de por ejemplo adenovirus que no se encuentran con títulos altos de anticuerpos neutralizantes. Ejemplos de tales adenovirus son los serotipos 11 y 35 (Ad11 y Ad35, véanse los documentos WO 00/70071 y WO 02/90665).

El contenido en ácido nucleico entre el patógeno que produce la malaria, tal como *P. falciparum*, y el huésped de interés, tal como *Homo sapiens*, es muy diferente. La invención proporciona ahora una solución a algunas de las desventajas de las vacunas conocidas en la técnica, tales como niveles de expresión que son demasiado bajos como para provocar una respuesta inmunitaria significativa en el huésped de interés, preferiblemente en seres humanos.

Los vectores virales recombinantes se han usado en sistemas de vacunas. Estos se ha demostrado para vacunas basadas en adenovirus. Se describe el uso de adenovirus recombinantes que tienen replicación defectuosa a través de la eliminación de al menos parte de la región E1 en el genoma adenoviral, puesto que se requiere la región E1 para los procesos de replicación, transcripción, traducción y empaquetamiento de los adenovirus recién formados. Los vectores con la región E1 delecionada se producen generalmente en líneas celulares que complementan las funciones de la región E1 delecionada. Tales líneas celulares y el uso de las mismas para la producción de virus recombinantes se han descrito ampliamente y se conocen bien en la técnica. Preferiblemente, se usan células

PER.C6[™], representadas por las células depositadas con ECACC n.º 96022940 en la Colección Europea de Cultivos de Células Animales (ECACC) en el Centre for Applied Microbiology and Research (CAMR, RU), para prevenir la producción de adenovirus de replicación competente (rca). En otra realización preferida, se aplican células que soportan el crecimiento de adenovirus recombinantes distintos de los derivados del serotipo 5 de adenovirus (Ad5). Se hace referencia a las publicaciones WO 97/00326, WO 01/05945, WO 01/07571, WO 00/70071, WO 02/40665 y WO 99/55132, para métodos y medios para obtener reservas de adenovirus libres de rca para Ad5 así como para otros serotipos de adenovirus.

Los vectores basados en adenovirus que se han usado en la técnica implican principalmente el uso de vectores Ad5. Sin embargo, tal como se ha descrito (documentos WO 00/03029, WO 02/24730, WO 00/70071, WO 02/40665 y en otros informes en la técnica), se dificulta la administración de Ad5 y la administración eficaz a las células diana de interés, responsables de respuestas inmunogénicas suficientes, por la presencia de altos títulos de anticuerpos neutralizantes que circulan en el torrente sanguíneo si se ha encontrado previamente una infección por Ad5 en un sujeto. Se ha investigado qué serotipos se adecuan mejor al uso terapéutico, y el resultado ha sido que un número limitado de serotipos encontraban anticuerpos neutralizantes en sólo un pequeño porcentaje de individuos en la población humana. Estos experimentos se han descrito en el documento WO 00/70071. La invención se refiere al uso de los serotipos 26 y 35 de adenovirus.

Aparte de evitar la presencia de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra ciertos serotipos, también puede ser beneficioso dirigir los vectores virales recombinantes de replicación deficiente a un determinado subconjunto de células implicadas en la respuesta inmunitaria. Tales células son por ejemplo células dendríticas. Se ha encontrado que determinados serotipos de adenovirus, tales como Ad16, Ad35 y Ad50, portan proteínas de la cápsida que se unen específicamente a determinados receptores presentes en células dendríticas (documento WO 02/24730). Ad5 es un serotipo que principalmente migra al hígado, lo que puede ser una desventaja si un número suficiente de partículas virales debe infectar a células del sistema inmunitario. Se encontró que al menos en experimentos *in vitro* algunos de los serotipos, diferentes de Ad5, podrían infectar células dendríticas múltiples veces mejor que Ad5, lo que sugiere que también la administración *in vivo* a tales células es más eficaz. Aún está por ver si esta traducción *in vitro* a *in vivo* se mantiene, y si serotipos distintos de Ad5 darán lugar al nivel de protección requerido. Se describen los serotipos de elección, en lo que concierne a anticuerpos neutralizantes, con proteínas de la cápsida, tales como la fibra o una parte de la misma de un serotipo que puede reconocer selectivamente células dendríticas.

Se sabe ahora que una primera administración con un serotipo de adenovirus específico provoca la producción de anticuerpos neutralizantes en el huésped contra ese vector específico. Por tanto, es deseable usar en una práctica posterior (un refuerzo de seguimiento o en la administración de otra vacuna no relacionada) una composición basada en un serotipo de adenovirus diferente, que no se neutraliza por anticuerpos generados en la primera administración. Por tanto, la memoria descriptiva da a conocer además métodos para vacunar individuos mamíferos en los que una composición de vacuna de sensibilización comprende un adenovirus recombinante de replicación defectuosa de un primer serotipo, mientras que en una composición de vacuna de refuerzo se usa un adenovirus recombinante de replicación defectuosa de un segundo serotipo. Las prácticas de sensibilización/refuerzo se han descrito en más detalle en las solicitudes de patente internacional PCT/NL02/00671 y PCT/EP03/50748 (sin publicar); estas solicitudes se refieren al uso de un vector de adenovirus recombinante de un primer serotipo para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad en un ser humano o animal tratado con un vector de adenovirus recombinante de un segundo serotipo, en el que dicho primer serotipo es diferente de dicho segundo serotipo, y en el que dicho primer serotipo se selecciona del grupo que consiste en: Ad11, Ad26, Ad34, Ad35, Ad46 y Ad49, y en el que dicho segundo serotipo es preferiblemente el serotipo 5 de adenovirus. Por tanto, se refiere al uso de diferentes serotipos de adenovirus que encuentran inmunidades preexistentes bajas en sujetos que van a tratarse. Ejemplos preferidos de tales serotipos son los recombinantes mencionados, en los que no se excluye Ad5 para individuos que nunca han experimentado una infección por Ad5. Las prácticas descritas y reivindicadas en las solicitudes mencionadas anteriormente se refieren al uso de vectores de adenovirus que portan transgenes tales como los del sarampión, o gag del VIH (para el tratamiento de seres humanos) o VIS (para el tratamiento y estudios en monos).

Un ejemplo no limitativo de un sistema de sensibilización-refuerzo contra la malaria es una práctica en la que pueden usarse, a continuación de diferentes serotipos de adenovirus, también diferentes determinantes antigénicos. Un ejemplo no limitativo de un antígeno diferente de CS es el antígeno específico del hígado 1 (LSA-1, Kurtis *et al.* 2001). Tales sistemas son al menos por un motivo útiles, concretamente que el antígeno CS se expresa principalmente durante el fase en sangre del parásito, mientras su expresión disminuye en la fase en el hígado. Para LSA-1, esta situación es más o menos la opuesta; se expresa a niveles bajos durante la fase en sangre, pero se expresa altamente durante la fase en el hígado. Aunque podrían usarse ambos antígenos en administraciones posteriores, también pueden usarse al mismo tiempo para proporcionar protección, contra el parásito en la fase en sangre así como en la fase en el hígado. En una realización adicional de la presente invención, ambos antígenos pueden suministrarse mediante uno sólo de los serotipos de adenovirus tal como se reivindica o bien clonados juntos en el mismo vector, o bien por separado en vectores separados del mismo serotipo). En otra realización, ambos antígenos se suministran mediante diferentes serotipos que pueden suministrarse al mismo tiempo o por separado en el tiempo, por ejemplo en una práctica de sensibilización-refuerzo. Las vacunas de la presente invención también pueden usarse en prácticas en las que se usa sensibilización-refuerzo en combinación con ADN

desnudo u otros medios de administración, sin relación con los vectores virales de replicación defectuosa de la presente invención, tales como péptidos o proteínas purificados. Ejemplos de tales proteínas que pueden usarse en sensibilización-refuerzo (Ad/proteína; proteína/Ad; proteína/Ad/Ad; Ad/proteína/Ad; Ad/Ad/proteína, etc.) son CS, LSA-1, LSA-3, MSP-1, MSP-119, MSP-142 (véase a continuación), o la composición de la vacuna derivada de CS y que contiene partículas de hepatitis B conocida como RTS,S (véase Gordon *et al.* (1995; documento US 6.306.625 y documento WO 93/10152).

Una secuencia es “de” un adenovirus tal como se usa en el presente documento si puede obtenerse un ácido nucleico a través de clonación directa a partir de secuencias de tipo natural obtenidas de virus de tipo natural, mientras que también pueden, por ejemplo, obtenerse a través de PCR usando diferentes trozos de ADN como molde. Esto significa también que tales secuencias pueden estar en la forma de tipo natural así como en forma alterada. Otra opción para alcanzar el mismo resultado es a través de la combinación de ADN sintético. Debe entenderse que “de” no significa exclusivamente una clonación directa del ADN de tipo natural. Un experto en la técnica también será consciente de las posibilidades de la biología molecular para obtener formas mutantes de un determinado trozo de ácido nucleico. Las expresiones “parte funcional, derivado y/o análogo del mismo” deben entenderse como equivalentes del ácido nucleico con el que están relacionados. Un experto en la técnica apreciará el hecho de que determinadas deleciones, cambios, mutaciones (puntuales), adiciones, etcétera pueden todavía dar como resultado un ácido nucleico que tiene una función similar que el ácido nucleico original. Por tanto, debe entenderse que también se consideran tales alteraciones que no alteran significativamente la funcionalidad de los ácidos nucleicos. Si un determinado vector de adenovirus es de un determinado serotipo de adenovirus de elección, debe entenderse que el producto final puede obtenerse a través de modos indirectos, tales como clonación directa y síntesis de determinados trozos de ADN genómico, usando metodología conocida en la técnica. Ejemplos de tales alteraciones son, por ejemplo, deleciones en la estructura principal del virus para permitir la clonación de trozos más grandes de ácidos nucleicos heterólogos. Ejemplos de tales mutaciones son por ejemplo deleciones de E3 o deleciones y/o alteraciones en las regiones que codifican para las proteínas E2 y/o E4 del adenovirus. Tales cambios aplicados a la estructura principal del adenovirus se conocen en la técnica y se aplican a menudo, puesto que el espacio es un factor limitante para que el adenovirus se empaquete; este es un motivo importante para deleccionar determinadas partes del genoma adenoviral. Otros motivos para alterar las regiones E2, E3 y/o E4 del genoma pueden estar relacionadas con la estabilidad o integridad del vector de adenovirus, tal como se describe, por ejemplo, en las solicitudes de patente internacional PCT/NL02/00280, PCT/EP03/50125, PCT/NL02/00281, PCT/EP03/50126 (sin publicar). Estas solicitudes se refieren entre otros al uso de un gen E4orf6 de un serotipo de un subgrupo en la estructura principal de un adenovirus de otro subgrupo, para garantizar la compatibilidad entre la actividad de E4orf6 y la actividad de E1B-55K durante la replicación y el empaquetamiento en una línea celular de empaquetamiento. Se refieren además al uso de un promotor pIX de funcionamiento apropiado para obtener niveles de expresión de pIX superiores y un vector de adenovirus recombinante más estable.

“De replicación defectuosa” tal como se usa en el presente documento significa que los vectores virales no se replican en células de no complementación. En células de complementación, las funciones requeridas para la replicación, y por tanto la producción del vector viral, se proporcionan por la célula de complementación. Los vectores virales de replicación defectuosa de la presente invención no albergan todos los elementos que permiten la replicación en una célula huésped distinta de una célula de complementación.

“Heterólogo” tal como se usa en el presente documento conjuntamente con ácidos nucleicos significa que el ácido nucleico no se encuentra en versiones de tipo natural de los vectores virales en los que se clona el ácido nucleico heterólogo. Por ejemplo, en el caso de los adenovirus, el ácido nucleico heterólogo que se clona en el vector de adenovirus de replicación defectuosa no es un ácido nucleico de adenovirus.

“Determinante antigénico” tal como se usa en el presente documento significa cualquier antígeno derivado de una fuente patógena que provoca una respuesta inmunitaria en un huésped hacia el determinante que se suministra (se administra). Ejemplos de determinante antigénicos de *Plasmodium* que pueden suministrarse usando los virus recombinantes de replicación defectuosa de la presente invención son la proteína circumsporozoíto, el polipéptido SE36, el polipéptido C-terminal de 119 kDa de la proteína de superficie de merozoíto (MSP-119), MSP-1, MSP-142, antígeno de la fase en el hígado 1 o 3 (LSA-1 o 3), o un fragmento de cualquiera de los mencionados anteriormente. En un aspecto preferido la invención se refiere a la proteína circumsporozoíto (CS) de *P. falciparum*.

“Con codones optimizados” tal como se usa en el presente documento significa que se ha alterado el contenido en el ácido nucleico para alcanzar niveles de expresión suficientemente altos de la proteína de interés en un huésped de interés a la que se suministra el gen que codifica para dicha proteína. Niveles de expresión suficientemente altos en este contexto significa que los niveles de proteína deben ser lo suficientemente altos como para provocar una respuesta inmunitaria en el huésped con el fin de proporcionar protección frente a un parásito que induce la malaria que puede entrar en el huésped tratado antes o después del tratamiento. Se sabe en la técnica que algunas vacunas proporcionan una respuesta inmunitaria en seres humanos, a través de la cual aproximadamente el 60% de los individuos vacunados están protegidos contra las dolencias inducidas por exposiciones posteriores con el patógeno (por ejemplo, esporozoítos). Por tanto, se considera que los niveles de expresión son suficientes si el 60% o más de los individuos tratados están protegidos contra infecciones posteriores. Se cree que con las combinaciones de aspectos de adenovirus que pueden aplicarse y la elección del antígeno tal como se da a conocer en el presente

documento, pueden alcanzarse tales porcentajes. Preferiblemente, el 85% de los individuos están protegidos, mientras que lo más preferido es tener protección frente a una exposición posterior en más del 90% de los huéspedes vacunados. Los ácidos nucleicos dados a conocer en la presente invención tienen codones optimizados para la expresión en seres humanos. Según Narum *et al.* (2001), el contenido en adenina más timina (A+T) en el ADN de *Homo sapiens* es de aproximadamente el 59%, en comparación con el porcentaje de citosina más guanina (C+G). El contenido en adenina más timina en *P. falciparum* es de aproximadamente el 80%. El contenido en adenina más timina en el gen de CS de *P. falciparum* es de aproximadamente el 87%. Para obtener suficiente protección se cree que es necesario mejorar los niveles de producción en el huésped. Un modo de lograr esto es optimizar la utilización de codones alterando el contenido en ácido nucleico del determinante antigénico en el vector basado en virus, sin alterar la secuencia de aminoácidos del mismo. Para esto, los vectores virales recombinantes de replicación defectuosa según la invención tienen un contenido en adenina más timina en los ácidos nucleicos heterólogos de la presente invención inferior al 87%, preferiblemente inferior al 80% y más preferiblemente inferior o igual a aproximadamente el 59%. Basándose en la utilización de codones en seres humanos y el contenido en aminoácidos de los genes de CS de *P. falciparum* y *yoelii*, los porcentajes de los genes con codones optimizados eran incluso inferiores, alcanzando aproximadamente el 45% para el contenido en aminoácidos tal como se da a conocer por la presente invención. Por tanto, en lo que concierne a los genes de CS, se prefiere tener un contenido en adenina más timina de aproximadamente el 45%. Debe entenderse que, si va a tratarse otra especie distinta de seres humanos, que puede tener una concentración diferente de adenina más timina (inferior o superior al 59%), y/o una utilización de codones diferente, los genes que codifican para las proteínas CS de la presente invención pueden ajustarse para adecuarse al contenido requerido y dar a lugar a niveles de expresión adecuados para ese huésped particular. Por supuesto, no puede excluirse tampoco que esos ligeros cambios en el contenido puedan dar como resultado ligeros cambios en el nivel de expresión en diferentes zonas geográficas alrededor del mundo. También debe entenderse que ligeros cambios en el número de repeticiones incluidas en la secuencia de aminoácidos de las proteínas, que los porcentajes pueden diferir en consecuencia. Todos estos contenidos ajustados son parte de la presente memoria descriptiva.

Ejemplos

Ejemplo 1. Ensamblaje del gen sintético de circumsporozoíto de *Plasmodium falciparum*.

Estudios comparativos llevados a cabo con vacunas de ADN basadas en genes con codones optimizados y nativos que codifican para proteínas de merozoítos de *P. falciparum* han indicado una correlación directa con los niveles de expresión e inmunogenicidad (Narum *et al.* 2001). Se diseñó una nueva secuencia del gen que codifica para la proteína circumsporozoíto de *Plasmodium falciparum* (CS). Estudios en poblaciones de parásitos de la malaria obtenidas de regiones geográficas ampliamente separadas han revelado la presencia de polimorfismo de secuencia de CS. Se ensambló la nueva secuencia de CS de *P. falciparum* mediante la alineación de las diferentes secuencias de proteína disponibles presentes en la base de datos de genBank (enumerada en la tabla I). En primer lugar, se colocaron todas las diferentes secuencias en el orden de subgrupos basándose en la ubicación global o por la cepa de laboratorio en el que se originaron los aislados. Se usaron todas las secuencias parciales o completas de CS con el fin de identificar la variación entre las diferentes zonas geográficas e identificar cepas de laboratorio. Se examinó exhaustivamente la secuencia consenso de aminoácidos final determinada. Los inventores de la presente invención ajustaron posteriormente esta secuencia consenso y para tener un nuevo gen de CS sintetizado (figura 1). Se muestra la secuencia de aminoácidos novedosa en la figura 1A. La nueva proteína CS alberga los aspectos enumerados a continuación (del extremo N-terminal al extremo C-terminal):

- La secuencia señal N-terminal, que dirigiría a la proteína al retículo endoplasmático, se deja sin cambiar.
- Los aminoácidos (31-40) del péptido de unión a HLA, así como la región 1 (epítipo de células B predominante) se conservan, por tanto estas secuencias se dejan sin cambiar.
- Un número de repeticiones: existen 14-41 repeticiones NANP (SEQ ID NO:10) en los diferentes aislados y 4 repeticiones NVDP (SEQ ID NO:11). Se eligió incorporar 27 repeticiones NANP, una agrupación de 3 repeticiones NVDP y una repetición NVDP separada.
- La secuencia ENANANNAVKN (SEQ ID NO:12) directamente en el sentido 3' de las repeticiones mencionadas anteriormente, se encontró que estaban razonablemente conservadas entre cepas.
- La región Th2R y el epítipo CD8 inmunodominante (Lockyer *et al.* 1989; Zevering *et al.* 1994): se determinó una única secuencia consenso que difiere en algunos aspectos de la conocida, y la secuencia 3D7 de la cepa de laboratorio frecuentemente usada. Esta secuencia se denomina algunas veces "epítipo universal" en la bibliografía (Nardin *et al.* 2001).
- La región 2, que se solapa con la región Th2R, se mantuvo conservada.
- La región TH3R, que se considera que es un epítipo CD8 menos importante, se usa en forma de una secuencia consenso, puesto que sólo se encontraron mutaciones puntuales.

- Los 28 aminoácidos C-terminales, que constituyen una secuencia de anclaje de señal GPI, que es ineficaz en células de mamíferos (Moran y Caras, 1994), y no es hidrófoba por sí misma para servir como anclaje a la membrana estable. Se construyó el gen de manera que puede eliminarse la secuencia completa, pero también dejando abierta la posibilidad de permanecer presente. Esto permite una comparación de la antigenicidad de los vectores de adenovirus que portan un CS de longitud completa frente a los que expresan la proteína delecionada en la secuencia de anclaje de señal GPI. De hecho, se ha descrito que la eliminación de la secuencia señal GPI de una vacuna de ADN de CS potenciaba la inducción sobre la respuesta inmunitaria contra la infección por malaria en roedores (Scheibelhofer *et al.* 2001).

- La sustitución de S por A en la posición 373: se introdujo esta sustitución de aminoácido para eliminar un posible sitio de glicosilación reconocido por células de mamíferos.

Puesto que la utilización de residuos del parásito de la malaria (el 87% de A y T) es significativamente diferente de la del *Homo sapiens*, el gen que codifica para la proteína CS recién diseñada tenía codones optimizados con el fin de mejorar su expresión en células de mamíferos, teniendo cuidado de los siguientes aspectos para evitar secuencias de actuación en cis: no deben estar presentes sitios de poli(A) prematuros y cajas TATA internas; deben evitarse sitios Chi, sitios de entrada del ribosoma y agrupaciones de secuencias ricas en A-T; no deben estar presentes sitios aceptores y donadores de corte y empalme (crípticos); deben evitarse tanto como sea posible tramos de secuencia repetitivos; y deben evitarse también las secuencias ricas en GC. Se muestra el gen con codones optimizados final en la figura 1B.

Se sintetizó la secuencia consenso CS recién diseñada y se clonó en un pCR-script (Stratagene) por GeneArt (Regensburg, Alemania), usando metodología conocida por los expertos en la técnica de generación de ADN sintético, dando lugar a un clon denominado 02-148 (pCR-script.Pf) (SEQ ID NO:1).

A continuación de este clon sintético, se generó otro gen sintético, en el que se introdujeron varias mutaciones para obtener una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la proteína CS de *P. falciparum* de la cepa 3D7 en el extremo 3', que además se deleciona en los últimos 14 aminoácidos (figura 2). Este gen también tenía codones optimizados usando las mismas condiciones que se describieron anteriormente y se sintetizó y clonó posteriormente en pCR-script (Stratagene) por GeneArt. El clon se denominó 02-659 (pf-aa-sub) (SEQ ID NO:4).

Ejemplo 2. Optimización de codones del gen de circumsporozoíto del parásito de la malaria específico de roedor *Plasmodium yoelii*.

Las especies de malaria que se han adaptado a modelos de roedores robustos, tales como *P. berghei* y *P. yoelii*, han sido potentes herramientas para la identificación y las pruebas de vacunas candidatas contra la malaria. Puesto que la infectividad de esporozoítos de *P. yoelii* se asemeja a la de *P. falciparum*, se decidió hacer uso del modelo de *P. yoelii* para la ejemplificación de la capacidad de los vectores de Ad35 que portan proteínas CS con codones optimizados para proporcionar inmunidad estéril y por tanto protección contra la infección por malaria. Se sometió a optimización de codones al gen de CS de *P. yoelii*, que codifica para los residuos 1-356 tal como se describió anteriormente (Rodrigues *et al.* 1997), usando las mismas condiciones que se describieron anteriormente y se sintetizó mediante GeneArt (GmbH-Regensburg, Alemania). La secuencia del gen de CS de *P. yoelii* con codones optimizados (plásmido 02-149) se representa en la figura 3.

Ejemplos 3. Generación de vectores de adenovirus recombinantes basados en Ad5.

Pueden generarse adenovirus recombinantes libres de RCA muy eficazmente usando plásmidos adaptadores, tales como pAdApt, y estructuras principales de plásmidos de adenovirus, tales como pWE/Ad.AfIII-rITRsp. Se han descrito métodos y herramientas extensamente en otro sitio (documentos WO 97/00326, WO 99/55132, WO 99/64582, WO 00/70071, WO 00/03029). Generalmente, se digiere el plásmido adaptador que contiene el transgén de interés en el casete de expresión deseado con enzimas adecuadas para liberar las secuencias de adenovirus recombinante de la estructura principal del vector de plásmido. De manera similar, se digiere el plásmido de complementación de adenovirus pWE/Ad.AfIII-rITRsp con enzimas adecuadas para liberar las secuencias de adenovirus del ADN del plásmido vector.

Se realizó la clonación del gen que codifica para la proteína CS del parásito *P. yoelii* en pIPspAdapt1 tal como sigue. Se digirió el plásmido 02-149 (GeneArt, véase anteriormente) que contiene el gen de CS con codones optimizados con las enzimas de restricción HindIII y BamHI. Se aisló el fragmento de 1,1 Kb que corresponde al gen de CS de *P. yoelii* del gel de agarosa y se ligó al vector pIPspAdapt1 digerido con HindIII y BamHI (descrito en el documento WO 99/64582). El plásmido resultante se denominó pAdapt.CS.Pyoel y contiene el gen de CS bajo el control transcripcional del promotor de citomegalovirus (CMV) inmediato-temprano (IE) humano de longitud completa y una señal de poli(A) de SV40 en el sentido de 3'.

Se realizó la clonación del gen que codifica para la proteína CS de longitud completa del parásito *P. falciparum* en pIPspAdapt1 tal como sigue. Se digirió el plásmido 02-148 pCR-script.Pf (véase anteriormente) que contiene el gen

de CS con codones optimizados con las enzimas de restricción HindIII y BamHI. Se aisló el fragmento de 1,2 kb correspondiente al gen de CS del gel de agarosa y se ligó al vector pIPspAdapt1 digerido con HindIII y BamHI. El plásmido resultante se denominó pAdapt.CS.Pfalc y contiene el gen de CS bajo el control transcripcional del promotor de citomegalovirus (CMV) inmediato-temprano (IE) humano de longitud completa y la señal de poli(A) de SV40 en el sentido de 3'.

Se realizó la clonación del gen que codifica para la proteína CS de *P. falciparum* menos la secuencia de anclaje GPI, por tanto con la delección de los últimos 28 aminoácidos, en pIPspAdapt1 tal como sigue. Se amplificó un fragmento de PCR de 1,1 kb usando el plásmido 02-148 como molde, con los cebadores Forw.Falc (5'-CCA AGC TTG CCA CCA TGA TGA GG-3') (SEQ ID NO:13) y Rev.Falc.CS-28 (5'-CCG GAT CCT CAG CAG ATC TTC TTC TCG-3') (SEQ ID NO:14). Invitrogen sintetizó los cebadores. Para la PCR, se usó la enzima Pwo ADN polimerasa (Inno-train Diagnostic), mientras que se aplicó el siguiente programa: 1 ciclo de 5 min. a 94°C, 1 min. a 50°C, 2 min. 30 s a 72°C; 5 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 50°C, 2 min. 50 s a 72°C; 20 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 54°C, 2 min. 50 s a 72°C; y 1 ciclo de 1 min. a 94°C, 1 min. a 54°C, seguido por 10 min. a 72°C. Se digirió el producto de PCR amplificado con las enzimas de restricción HindIII y BamHI y luego se clonó en pIPspAdapt1 que también se digirió con HindIII y BamHI. El plásmido resultante se denominó pAdapt.CS.Pfalc(-28) y contiene el gen de CS bajo el control transcripcional del promotor de citomegalovirus (CMV) inmediato-temprano (IE) humano de longitud completa y la señal de poli(A) de SV40 en el sentido de 3'.

Se realizó la clonación del gen que codifica para la proteína CS de *P. falciparum* menos el anclaje GPI, por tanto con la delección de los últimos 14 aminoácidos, en pIPspAdapt1 tal como sigue. Se amplificó un fragmento de PCR de 1,1 kb usando el plásmido 02-148 como molde, con los cebadores Forw.Falc (SEQ ID NO:13) y Rev.Falc.CS-14 (5'-CCG GAT CCT CAG CTG TTC ACC ACG TTG-3') (SEQ ID NO:15). Invitrogen sintetizó los cebadores. Para la PCR, se usó la enzima Pwo ADN polimerasa (Inno-train Diagnostic), mientras que se aplicó el siguiente programa: 1 ciclo de 5 min. a 94°C, 1 min. a 50°C, 2 min. 30 s a 72°C; 5 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 50°C, 2 min. 50 s a 72°C; 20 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 54°C, 2 min. 50 s a 72°C; y 1 ciclo de 1 min. a 94°C, 1 min. a 54°C, seguido por 10 min. a 72°C. Se digirió el producto de PCR amplificado con las enzimas de restricción HindIII y BamHI y luego se clonó en pIPspAdapt1 también digerido con HindIII y BamHI. El plásmido resultante se denominó pAdapt.CS.Pfalc(-14) y contiene el gen de CS bajo el control transcripcional del promotor de citomegalovirus (CMV) inmediato-temprano (IE) humano de longitud completa y la señal de poli(A) de SV40 en el sentido de 3'.

Se realizó la clonación del gen que codifica para la proteína CS de *P. falciparum* menos el anclaje GPI, que muestra una secuencia C-terminal como en la cepa 3D7, en pIPspAdapt1 tal como sigue. Se digiere el plásmido 02-659 pf-aa-sub (véase anteriormente) que contiene el gen de CS con codones optimizados con las enzimas de restricción HindIII y BamHI. Se ligó el fragmento de 1,1 kb correspondiente al gen de CS al vector pIPspAdapt1 digerido con HindIII y BamHI. El plásmido resultante se denominó pAdapt.CS.Pfalc (pf-aa-sub) y contiene el gen de CS bajo el control transcripcional del promotor de citomegalovirus (CMV) inmediato-temprano (IE) humano de longitud completa y la señal de poli(A) de SV40 en el sentido de 3'.

Se realizó la generación del virus recombinante denominado Ad5ΔE3.CS.Pyoel tal como sigue. Se digirió pAdapt.CS.Pyoel con la enzima de restricción Pacl para liberar la parte del extremo izquierdo del genoma de Ad. El plásmido pWE/Ad.AfIII-rITRsp que contiene la parte del extremo derecho restante del genoma de Ad tiene una delección de 1878 pb en la región E3 (delección XbaI). También se digirió este constructo con Pacl. Se transfectó por separado pAdapt.CS.Pyoel con PWE.Ad.AfIII-rITRsp digerido con Pacl en células productoras PER-E1B55K (células que se han descrito en el documento WO 02/40665) usando reactivo de transfección lipofectamina (Invitrogen) usando métodos conocidos en la técnica y tal como se describe en el documento WO 00/70071. La recombinación homóloga entre secuencias solapantes condujo a la generación del virus recombinante denominado Ad5ΔE3.CS.Pyoel. Debe entenderse que también pueden producirse vectores basados en Ad5 en células PER.C6TM, células que están representadas por las células depositadas con el n.º de la ECACC 96022940 (véase anteriormente). Se purificó en placa el vector de adenovirus, en lisados brutos, resultante de esta transfección usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Se analizaron placas individuales para detectar la presencia del transgén CS y se amplificaron para producción a gran escala en matraces de triple capa (3 x 175 cm²/matraz). Se recogen las células tras la amplificación a CPE completo y se purifica el virus mediante un procedimiento de purificación con cloruro de cesio (CsCl) de dos etapas tal como realizan de manera rutinaria los expertos en la técnica y generalmente tal como se describe en el documento WO 02/40665.

Se realizó la generación del virus recombinante denominado Ad5ΔE3.CS.Pfalc tal como sigue. Se digirió pAdapt.CS.Pfalc con la enzima de restricción Pacl para liberar la parte del extremo izquierdo del genoma de Ad. El plásmido pWE/Ad.AfIII-rITRsp que contiene la parte del extremo derecho restante del genoma de Ad tiene una delección de 1878 pb en la región E3 (delección XbaI). También se digirió este constructo con Pacl. Se transfectó pAdapt.CS.Pfalc con PWE.Ad.AfIII-rITRsp digerido con Pacl en células productoras PER-E1B55K usando reactivo de transfección lipofectamina. La recombinación homóloga entre secuencias solapantes condujo a la generación del virus recombinante denominado Ad5ΔE3.CS.Pfalc. Se purificó en placa el vector de adenovirus, en lisados brutos, resultante de esta transfección usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Se analizaron placas individuales para detectar la presencia del transgén CS y se amplificaron para la producción a gran escala en matraces de triple capa (3 x 175 cm²/matraz). Se recogieron las células a CPE completo y se purificó el virus

mediante un procedimiento de purificación con CsCl de dos etapas tal como realizan de manera rutinaria los expertos en la técnica y generalmente tal como se describe en el documento WO 02/40665.

5 Se realizó la generación de los virus recombinantes denominados Ad5ΔE3.CS.Pfalc(-28) y Ad5ΔE3.CS.Pfalc(-14) tal como sigue. Se digirieron pAdapt.CS.Pfalc(-28) y pAdapt.CS.Pfalc(-14) por separado con la enzima de restricción Pacl para liberar la parte del extremo izquierdo del genoma de Ad. El plásmido pWE/Ad.AfIII-rITRsp que contiene la parte del extremo derecho restante del genoma de Ad tiene una delección de 1878 pb en la región E3 (delección XbaI).
10 También se digirió este constructo con Pacl. Se transfectaron por separado pAdapt.CS.Pfalc(-28) y pAdapt.CS.Pfalc(-14) con PWE.Ad.AfIII-rITRsp digerido con Pacl en células productoras PER-E1B55K usando reactivo de transfección lipofectamina. La recombinación homóloga entre secuencias solapantes condujo a la generación de virus recombinantes denominados respectivamente Ad5ΔE3.CS.Pfalc(-28) y Ad5ΔE3.CS.Pfalc(-14). Se purifican en placa los vectores de adenovirus en lisados brutos que resultan de estas transfecciones usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Se analizaron placas individuales para detectar la presencia del transgén CS y se amplificaron para la producción a gran escala en matraces de triple capa (3 x 175 cm²/matraz).
15 Se recogen las células a CPE completo y se purifica el virus mediante un procedimiento de purificación con CsCl de dos etapas tal como realizan de manera rutinaria los expertos en la técnica y generalmente tal como se describe en el documento WO 02/40665.

20 Se realizó la generación del virus recombinante denominado Ad5ΔE3.CS.Pfalc(pf-aa-sub) tal como sigue. Se digiere pAdapt.CS.Pfalc(pf-aa-sub) con la enzima de restricción Pacl para liberar la parte del extremo izquierdo del genoma de Ad. El plásmido pWE/Ad.AfIII-rITRsp que contiene la parte del extremo derecho restante del genoma de Ad también se digiere con Pacl, se transfecta pAdapt.CS.Pfalc(pf-aa-sub) con PWE.Ad.AfIII-rITRsp digerido con PaclΔE3 en células productoras PER.C6@ o PER-E1B55K usando reactivo de transfección lipofectamina, o mediante otros medios tales como electroporación u otros métodos de transfección conocidos por los expertos en la técnica. La recombinación homóloga entre secuencias solapantes conduce a la generación del virus recombinante denominado Ad5ΔE3.CS.Pfalc(pf-aa-sub). Se purifica en placa el vector de adenovirus, en lisados brutos, resultante de esta transfección usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Se analizaron placas individuales para detectar la presencia del transgén CS y se amplificó para la producción a gran escala en matraces de triple capa (3 x 175 cm²/matraz).
30 Se recogen las células a CPE completo y se purifica el virus mediante un procedimiento de purificación de CsCl de dos etapas tal como realizan de manera rutinaria los expertos en la técnica y generalmente tal como se describe en el documento WO 02/40665.

A continuación de estos procedimientos, se llevó a cabo la generación del adenovirus recombinante de control denominado Ad5ΔE3.empty tal como se describió anteriormente, usando como adaptador el plásmido pAdapt, que carece de un transgén.
35

Ejemplo 4. Generación de vectores de vacuna de adenovirus recombinante basados en Ad35.

40 Se generó un primer fragmento de PCR de 101 pb que contenía el promotor pIX de Ad5 (nucleótidos 1509-1610) con los cebadores SV40for (5'-CAA TGT ATC TTA TCA TGT CTA G-3') (SEQ ID NO:16) y pIX5Rmfe (5'-CTC TCT CAA TTG CAG ATA CAA AAC TAC ATA AGA CC-3') (SEQ ID NO:17). Se realizó la reacción con Pwo ADN polimerasa según las instrucciones de los fabricantes pero con DMSO al 3% en la mezcla final. Se usó pAdApt como molde. Se estableció el programa tal como sigue: 2 min. a 94°C; 30 ciclos de: 30 s a 94°C, 30 s a 52°C y 30 s a 72°C; seguido por 8 min. a 72°C. El fragmento de PCR resultante contiene el extremo 3' de la señal de poli(A) de SV40 de pAdApt y la región promotora Ad5-pIX tal como está presente en el número de registro de Genbank M73260 desde el nucleótido 3511 hasta el nucleótido 3586 y un sitio MfeI en el extremo 3'. Se generó un segundo fragmento de PCR tal como se describió anteriormente pero con los cebadores pIX35Fmfe (5'-CTC TCT CAA TTG TCT GTC TTG CAG CTG TCA TG-3') (SEQ ID NO:18) y 35R4 (para la referencia de la secuencia del cebador 35R4, véase el documento WO 00/70071). Se usó pAdApt35IP1 (descrito en el documento WO 00/70071) como molde, se estableció la hibridación a 58°C durante 30 s y se estableció el alargamiento del programa de PCR a 72°C durante 90 s. Este procedimiento de PCR amplifica secuencias de Ad35 desde el nucleótido 3467 hasta el nucleótido 4669 (numeración de la secuencia como en el documento WO 00/70071) y añade un sitio MfeI al extremo 5'. Se digirieron ambos fragmentos de PCR con MfeI y se purificaron usando el kit de purificación de PCR Qiagen (Qiagen). Se usaron cantidades equimolares aproximadas de los dos fragmentos en una reacción de ligación. Tras una incubación de dos horas con la enzima ligasa en los tampones correctos, a temperatura ambiente, se cargó la mezcla en un gel de agarosa y se aislaron los fragmentos de ADN de 1,4 kb de longitud con el kit GeneClean II (BI0101, Inc). Se usó el ADN purificado en una reacción de amplificación por PCR con los cebadores SV40for y 35R4. Se realizó la PCR tal como se describió anteriormente con una temperatura de hibridación de 52°C y tiempo de alargamiento de 90 s. Se aisló el producto resultante del gel usando el kit de extracción de gel Qiagen y se digirió con AgeI y BglII. Se aisló del gel el fragmento de 0,86 kb resultante que contenía el promotor pIX de 100 nucleótidos completo de Ad5, el sitio MfeI y el ORF de pIX (fragmento MfeI-AgeI, que incluye el sitio de iniciación ATG) de Ad35, pero sin una secuencia de poli(A), usando el kit GeneClean II.
55
60

65 Pueden regenerarse adenovirus recombinantes libres de RCA basados en Ad35 muy eficazmente usando plásmidos adaptadores, tales como pAdApt535 (descrito a continuación) y estructuras principales de plásmidos de adenovirus,

tales como pWE/Ad35.pIX-rITRΔE3 (descrito en el documento WO 02/40665). Para generar pAdApt535, se digirió pAdApt35.Luc (descrito en el documento WO 00/70071) con BgIII y AgeI y se aisló el vector de 5,8 kb resultante del gel. Se ligó este fragmento con el fragmento BgIII-AgeI de 0,86 kb resultante que contenía el promotor pIX quimérico de Ad5-Ad35 descrito anteriormente, para dar como resultado un plásmido denominado pAdApt535.Luc, que se digirió posteriormente con BgIII y ApaI. Se purificó el inserto de 1,2 kb resultante sobre gel. Se digirió pAdApt35IP1 con BgIII y ApaI y se aisló el fragmento de vector de 3,6 kb sobre gel. La ligación del inserto de BgIII-ApaI de 1,2 kb a partir de pAdApt535.Luc y el vector digerido con BgIII-ApaI de 3,6 kb dio como resultado pAdApt535.

Se realizó la clonación del gen que codifica para la proteína CS del parásito *P. yoelii* en pAdapt535 tal como sigue. Se digirió el plásmido 02-149 que contenía el gen de CS de *P. yoelii* con codones optimizados (véase anteriormente) con las enzimas de restricción HindIII y BamHI. Se aisló el fragmento de 1,1 kb correspondiente al gen de CS sobre gel de agarosa y se ligó al vector pAdapt535 digerido con HindIII y BamHI. El plásmido resultante se denominó pAdapt535-CS.Pyoel y contiene el gen de CS bajo el control transcripcional del promotor de CMV humano de longitud completa y la señal de poli(A) de SV40 en el sentido de 3'.

Se realizó la clonación del gen que codifica para la proteína CS de longitud completa del parásito *P. falciparum* en pAdapt535 tal como sigue. Se digirió el plásmido 02-148 (pCR-script.Pf) que contenía el gen de CS con codones optimizados de *P. falciparum* con las enzimas de restricción HindIII y BamHI. Se aisló el fragmento de 1,2 kb correspondiente al gen de CS sobre gel de agarosa y se ligó al vector pAdapt535 digerido con HindIII y BamHI. El plásmido resultante se denominó pAdapt535-CS.Pfalc y contiene el gen de CS bajo el control transcripcional del promotor de CMV humano de longitud completa y la señal de poli(A) de SV40 en el sentido de 3'.

Se realizó la clonación del gen que codifica para la proteína CS de *P. falciparum* menos la secuencia de anclaje GPI, por tanto con la delección de los últimos 28 aminoácidos, en pAdapt535 tal como sigue. Se digirió el fragmento de PCR de 1,1 kb obtenido tal como se describió anteriormente usando los cebadores Forw.Falc y Rev.Falc.CS-28, con las enzimas de restricción HindIII y BamHI y luego se clonó en el vector pAdapt535 también digerido con HindIII y BamHI. El plásmido resultante se denominó pAdapt535-CS.Pfalc(-28) y contiene el gen de CS bajo el control transcripcional del promotor de CMV humano de longitud completa y la señal de poli(A) de SV40 en el sentido de 3'.

Se realiza la clonación del gen que codifica para la proteína CS de *P. falciparum* menos la secuencia de anclaje GPI, ahora con la delección de los últimos 14 aminoácidos, en pAdapt535 tal como sigue. Se digiere el fragmento de PCR de 1,1 kb obtenido tal como se describió anteriormente usando los cebadores Forw.Falc y Rev.Falc.CS-14, con las enzimas de restricción HindIII y BamHI y luego se clona denle el vector pAdapt535 también digerido con HindIII y BamHI. El plásmido resultante se denomina pAdapt535-CS.Pfalc(-14) y contiene el gen de CS bajo el control transcripcional del promotor de CMV humano de longitud completa y la señal de poli(A) de SV40 en el sentido de 3'.

Se realiza la clonación del gen que codifica para la proteína CS de *P. falciparum* menos la secuencia de anclaje GPI, que muestra una secuencia del extremo C-terminal como en la cepa 3D7, en pAdapt535 tal como sigue. Se digiere el plásmido 02-659 pf-aa-sub (véase anteriormente) que contiene el gen de CS con codones optimizados con las enzimas de restricción HindIII y BamHI. Se liga el fragmento de 1,1 kb correspondiente al gen de CS al vector pAdapt535 digerido con HindIII y BamHI. El plásmido resultante se denomina pAdapt535-CS.Pfalc(pf-aa-sub) y contiene el gen de CS bajo el control transcripcional del promotor de CMV humano de longitud completa y la señal de poli(A) de SV40 en el sentido de 3'.

Se realizó la generación del virus recombinante denominado Ad35ΔE3.CS.Pyoel tal como sigue. Se digirió pAdapt535.CS.Pyoel con la enzima de restricción PacI para liberar la parte del extremo izquierdo del genoma de Ad. Se digirió el plásmido pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3, que contiene la parte del extremo derecho restante del genoma de Ad con una delección de 2673 pb en la región E3, con NotI. Se transfectó pAdapt535.CS.Pyoel con pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3 digerido con NotI en células productoras PER-E1B55K usando reactivo de transfección lipofectamina. Se ha descrito en detalle la generación de la línea celular PER-E1B55K en el documento WO 02/40665. En resumen, esta publicación describe que se transfectaron de manera estable células PER.C6® con ADN de pIG35-55K linealizado con Scal, que porta el gen E1B-55K del serotipo 35 de adenovirus, tras lo cual un procedimiento de selección con-G41-8 produjo 196 colonias recogidas. El cultivo adicional de un número limitado de colonias que crecen bien dio como resultado líneas celulares estables que tras numerosos subcultivos expresaban de manera estable el gen E1B-55K de Ad35 y soportaban el crecimiento de virus Ad35 recombinantes, mientras que la célula PER.C6® original era muy ineficaz en el soporte de esto.

La recombinación homóloga entre secuencias solapantes condujo a la generación del virus recombinante denominado Ad35ΔE3.CS.Pyoel. Se purificó en placa el vector de adenovirus, en lisados brutos, resultante de esta transfección usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Se analizaron placas individuales para determinar la presencia del transgén CS y se amplificaron para la producción a gran escala en matraces de triple capa (3 x 175 cm²/matraz). Tras la amplificación, se recogieron las células a CPE completo y se purificó el virus mediante un procedimiento de purificación con CsCl de dos etapas tal como realizan de manera rutinaria los expertos en la técnica y generalmente tal como se describe en el documento WO 02/40665.

Se realizó la generación del virus recombinante denominado Ad35ΔE3.CS.Pfalc tal como sigue. Se digirió pAdapt535.CS.Pfalc con la enzima de restricción Pacl para liberar la parte del extremo izquierdo del genoma de Ad. Se digirió el plásmido pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3, que contiene la parte del extremo derecho restante del genoma de Ad con una delección de 2673 pb en la región E3, con NotI. Se transfeció pAdapt535.CS.Pfalc con pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3 digerido con NotI en células productoras PER-E1B55K usando reactivo de transfección lipofectamina. La recombinación homóloga entre secuencias solapantes condujo a la generación del virus recombinante denominado Ad35ΔE3.CS.Pfalc. Se purificó en placa el vector de adenovirus, en lisados brutos, resultante de esta transfección usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Se analizaron placas individuales para detectar la presencia del transgén CS y se amplificaron para la producción a gran escala en matraces de triple capa (3 x 175 cm²/matraz). Tras la amplificación, se recogieron las células a CPE completo y se purificó el virus mediante el procedimiento de purificación con CsCl de dos etapas tal como realizan de manera rutinaria los expertos en la técnica y generalmente tal como se describe en el documento WO 02/40665.

Se realiza la generación de los virus recombinantes denominados Ad35ΔE3.CS.Pfalc(-28) y Ad35ΔE3.CS.Pfalc(-14) tal como sigue. Se digirieron por separado pAdapt535.CS.Pfalc(-28) y pAdapt535.CS.Pfalc(-14) con la enzima de restricción Pacl para liberar la parte del extremo izquierdo del genoma de Ad. Se digirió el plásmido pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3 que contiene la parte del extremo derecho restante del genoma de Ad con NotI. Se transfectan por separado pAdapt535.CS.Pfalc(-28) y pAdapt535.CS.Pfalc(-14) con pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3 digerido con NotI en un productor PER-E1B55K. La recombinación homóloga entre secuencias solapantes conduce a la generación de virus recombinantes denominados respectivamente Ad35ΔE3.CS.Pfalc(-28) y Ad35ΔE3.CS.Pfalc(-14). Se purifican en placa los vectores de adenovirus, en lisados brutos, resultantes de estas transfecciones usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Se analizan placas individuales para detectar la presencia del transgén CS y se amplificaron para la producción a gran escala en matraces de triple capa (3 x 175 cm²/matraz). Se recogieron las células a CPE completo y se purifica el virus mediante el procedimiento de purificación con CsCl de dos etapas tal como realizan de manera rutinaria los expertos en la técnica y generalmente tal como se describe en el documento WO 02/40665.

Se realiza la generación del virus recombinante denominado Ad35ΔE3.CS.Pfalc(pf-aa-sub) tal como sigue. Se digiere pAdapt535.CS.Pfalc(pf-aa-sub) con la enzima de restricción Pacl para liberar la parte del extremo izquierdo del genoma de Ad. Se digiere el plásmido pWE.Ad35.pIX-rITRΔE3 que contiene la parte del extremo derecho restante del genoma de Ad con NotI. Se transfecta pAdapt535.CS.Pfalc(pf-aa-sub) con pTnTE.Ad35.pIX-rITRΔE3 digerido con NotI en células productoras PER-E1B55K usando reactivo de transfección lipofectamina (Invitrogen) usando métodos conocidos en la técnica y tal como se describe en el documento WO 00/70071 o mediante electroporación u otros métodos de transfección conocidos por los expertos en la técnica. La recombinación homóloga entre secuencias solapantes conduce a la generación del virus recombinante denominado Ad35ΔE3.CS.Pfalc(pf-aa-sub). Se purifica en placa el vector de adenovirus, en lisados brutos, resultante de esta transfección usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Se analizan placas individuales para la detectar la presencia del transgén CS y se amplifican para la producción a gran escala en matraces de triple capa (3 x 175 cm²/matraz). Se recogen las células a CPE completo y se purifica el virus mediante el procedimiento de purificación con CsCl de dos etapas tal como realizan de manera rutinaria los expertos en la técnica y generalmente tal como se describe en el documento WO 02/40665.

Ejemplo 5. Inducción de protección contra la infección por malaria de *P. yoelii* usando vacunas basadas en adenovirus recombinante *in vivo*.

Los vectores basados en el serotipo 5 de adenovirus (Ad5) modificados mediante ingeniería genética para expresar el antígeno CS de la malaria de roedor por *P. yoelii* han mostrado que pueden inducir protección completa contra la infección por *P. yoelii* (Rodrigues *et al.* 1997). Se diseñó una comparación lado a lado entre los vectores Ad5 y Ad35 que portan el gen CD de *P.yoelli* con codones optimizados para investigar la respuesta inmunitaria que se induce, y para investigar su capacidad en la generación de protección contra la infección por el parásito *P. yoelii* en ratones. El estudio incluyó ratones Balb/C que se inmunizaron mediante inyección subcutánea o intramuscular de 10⁸-10¹⁰ partículas virales (pv) de vectores virales basados en Ad5ΔE3- o Ad35ΔE3 (tal como se describió anteriormente) que o bien portaban el gen de CS de *P. yoelii*(Ad5ΔE3-CS.Pyoel y Ad35ΔE3-CS.Pyoel) o bien sin transgén (Ad5ΔE3-empty y Ad35ΔE3-empty). La figura 4 muestra los resultados de los experimentos en los que se comparó la vía de administración usando ambos vectores. Se determinó el número de células que segregan IFN-γ en una población de 10⁶ esplenocitos (figura 4A) así como los títulos de anticuerpos en el suero (figura 4B). Se realizaron los experimentos en ratones que se sacrificaron dos semanas tras la inyección con los adenovirus recombinantes. Cada una de las barras representa el promedio de 5 ratones. Si los ratones no se sacrificaron, se usaron para una exposición con esporozoítos vivos, tras lo que se determinó la tasa de protección (figuras 5A y B). Cada una de estas barras representa el promedio de 5 ratones. Se realizan los experimentos sobre las respuestas inmunitarias celular y humoral con ensayos inmunológicos bien conocidas por los expertos en la técnica y tal como se describe por ejemplo por Bruña-Romero *et al.* (2001a). Se programan la inmunización, la exposición y las lecturas en las tablas II y III. Pueden determinarse los títulos de anticuerpos contra esporozoítos mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta o con un ELISA. La figura 4B muestra los resultados tal como se calcularon con un ELISA. Se determinaron las respuestas inmunitarias celulares mediante ensayo ELISPOT *ex-vivo* que mide el

número relativo de células T CD8+ y CD4+ específicas de CS, que segregan IFN- γ . Se monitorizó la protección contra la infección por malaria determinando los niveles de inhibición parasitaria en los hígados de ratones inmunizados a través de cuantificación por PCR con transcriptasa inversa de las copias de ARN ribosómico de *P.yoelii*.

5 Se realizó la inmunización con vectores basados en Ad5 y Ad35 tal como sigue. Se descongelaron gradualmente en hielo alícuotas de adenovirus recombinantes que se almacenaron a -70°C y se diluyeron hasta 100 μ l en la concentración deseada en PBS con suero de ratón normal inactivado por calor al 1%. Posteriormente, se sonicaron las muestras durante 5 s. Se realizó la administración subcutánea en ambos lados de la base de la cola con un volumen de 50 μ l en cada lado. Se realizó la administración intramuscular en ambos muslos con un volumen de 50 μ l en cada muslo.

15 Se realiza el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA) según Bruña-Romero *et al.* (2001a). En primer lugar, se generan mosquitos infectados infectando inicialmente un ratón sin tratamiento previo con un mosquito infectado haciendo que piquen al ratón en tres sitios diferentes. Se extrae sangre del ratón tras 8 días cuando la parasitemia es del 4-8% y se diluye hasta el 1%. Entonces, se les inyecta i.p. a otros ratones la muestra de sangre diluida. Tras 3 días, se toma la sangre que sirve como alimento de sangre para mosquitos hambrientos. Estos se alimentan durante 2 días. Tras 14 días, se aíslan esporozoítos de *P. yoelii* a partir de los mosquitos alimentados con sangre anestesiando mosquitos infectados sobre hielo y posteriormente saturándolos en etanol al 70%. Entonces, se transfieren los mosquitos a PBS pH 7,4 y se disecan las glándulas salivales. Posteriormente se muelen éstas sobre hielo y se separan los esporozoítos del residuo mediante centrifugación. Usando este método, pueden obtenerse aproximadamente 35.000 esporozoítos de *P. yoelii* a partir de 1 mosquito. Entonces, se recubren portaobjetos de vidrio en una placa de 12 múltiples pocillos con aproximadamente 10.000 esporozoítos de *P. yoelii* cada uno en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) más suero bovino fetal al 10% mediante secado al aire. Se incuban posteriormente una gama de diluciones de sueros de los ratones vacunados (en un volumen de 10 μ l en PBS mas FBS al 5%) con los esporozoítos secados al aire durante 30 min. a temperatura ambiente en un entorno húmedo. Entonces, se aspiran los portaobjetos, se lavan dos veces con PBS y se añaden 10 μ l de un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con FITC diluido 30 veces (Kirkegaard & Perry Laboratories, EE.UU., n.º de catálogo 02-18-06) y se incuba durante 30 min. a temperatura ambiente. Se aspiran de nuevo los pocillos y se lavan dos veces. Para la contraincubación, se incuba una disolución de bromuro de etidio 100 μ g/ml durante 10 min., tras lo que se repite la etapa de aspiración y se lavan los pocillos con agua. Se montan los portaobjetos usando Permount que contiene fenilendiamina/anti-desvanecimiento. Se determinan los títulos de anticuerpos anti-esporozoíto como la dilución de suero más alta que produce fluorescencia. Para la determinación de los títulos de anticuerpos, también puede usarse un ELISA. Para esto, se recubrieron placas de ELISA (Immulon II, Dynatech) con antígeno 2 μ g/ml en PBS añadiendo 100 μ l por pocillo de esta disolución y dejándola durante la noche a 4°C. El antígeno que se usó es una repetición de 3x6 aminoácidos de la proteína CS de *P.yoelii*: QGPGAPQGPGAPQGPGAP (SEQ ID NO:19). Se lavaron las placas posteriormente tres veces con tampón de lavado (1x PBS, Tween al 0,05%), y se añadieron 200 μ l de tampón de bloqueo (FCS al 10% en disolución de lavado) por pocillo. Se incubaron las placas durante 1-2 h a temperatura ambiente. Entonces, se lavaron las placas tres veces de nuevo con tampón de lavado que incluía FCS al 5%. Se prepararon diluciones de los sueros tal como sigue: Se añadieron 50 μ l tampón de lavado más FCS al 5% a los pocillos 2-12. Entonces, se añaden 100 μ l de tampón de lavado más FCS al 5% al primer pocillo y se preparan diluciones en serie 1:2 transfiriendo 50 μ l del pocillo 1 al 2, luego del 2 al 3, etc. Se incuban las placas durante 1 h a temperatura ambiente. Entonces, se lavan las placas tres veces con tampón de lavado y se añaden 100 μ l de un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa diluido 1:2000 (anti-cadena pesada y ligera, absorbido humano, Kirkegaard & Perry Laboratories, n.º de catálogo 074-1806) por pocillo y se incuba. Entonces, se lavan las placas con tampón de lavado tres veces y una vez con PBS y luego se añaden 100 μ l de disolución de sustrato ABTS (ABTS 1-Component, Kirkegaard & Perry Laboratories, número de catálogo 50-66-18) a cada pocillo. Se termina la reacción mediante la adición de 50 μ l de SDS al 1%, y se leen las placas a 405 nm en un lector de ELISA.

50 Se realizaron el ensayo ELISPOT para determinar el número relativo de células T CD8+ y CD4+ específicas de CS, que segregan IFN- γ en el bazo, y la PCR con transcriptasa inversa y PCR en tiempo real para cuantificar la cantidad de ARN específico de parásito presente en el hígado de los ratones expuestos tal como se describió por Bruña-Romero *et al.* (2001a y 2001b) excepto por el hecho de que el número de ciclos en la PCR en tiempo real fue de 45.

55 Aunque se predijo la atenuación de la infección por *P. yoelii* en receptores de la vacuna Ad5 Δ E3-CS.Pyoel (Rodríguez *et al.* 1997), se espera que la vacunación con Ad35 Δ E3-CS.Pyoel sea superior o al menos igualmente eficaz.

60 La figura 4A muestra que con una administración de 10⁹ y 10¹⁰ partículas virales por ratón, el vector basado en Ad35 es al menos tan eficaz en la inducción de una respuesta inmunitaria celular como el vector basado en Ad5, si no superior. Puede concluirse que con este sistema no hay diferencia drástica en la respuesta celular tal como se indicó por el número de células que segregan IFN- γ tras la administración intramuscular y subcutánea.

La figura 4B muestra los títulos de anticuerpos en el mismo experimento y realizado sobre los mismos sueros usando el experimento de inmunofluorescencia indirecta tal como se resumió anteriormente. Si se compara con los resultados mostrados en la figura 4A, queda claro que a una dosis de 10^9 partículas virales, el vector basado en Ad35 induce una respuesta inmunitaria celular significativa pero no da lugar a títulos muy altos de anticuerpos antiesporozoítos. De nuevo, no hay diferencia significativa entre las dos vías de administración.

Posteriormente, se expusieron i.v. los animales que recibieron diferentes dosis de vectores basados en Ad5 y Ad35 que expresan el antígeno CS de *P. yoelii* con codones optimizados con 10^5 esporozoítos purificados tal como se describió anteriormente. Se muestran los resultados de estos experimentos en la figura 5A y B. Se calculó el porcentaje de inhibición en comparación con ratones sin tratamiento previo que no se inmunizaron.

Los ratones que se inmunizaron recibieron s.c. 10^9 ó 10^{10} partículas virales (pv) y se expusieron tras 14 días con los esporozoítos y luego se sacrificaron tras 48 h. Los controles negativos eran vectores vacíos sin antígeno y ratones no inmunizados. Claramente, se obtiene un alto porcentaje de inhibición cuando se usa el vector basado en Ad5 así como con el vector basado en Ad35, aplicando las dos dosis, mientras que no se encontró protección en los controles negativos (figura 5A). De manera importante, sólo un bajo número de ARN ribosómico 18S específico de parásito pudo determinarse en el hígado de los ratones inmunizados, mientras que los ratones que no recibieron vector de adenovirus o recibieron vectores vacíos contenían grandes números de estos ARN (figura 5B). Esto indica fuertemente que el vector basado en Ad35, como el vector basado en Ad5, puede dar lugar a protección significativa contra el parásito de la malaria, incluso tras una única ronda de inmunización.

Ejemplo 6. Inducción de inmunidad contra la infección por malaria de *P. falciparum* usando vacunas basadas en adenovirus recombinante *in vivo*.

Se diseñó una comparación lado a lado entre los vectores de serotipo 5 de adenovirus (Ad5) y de serotipo 35 de adenovirus (Ad35) para investigar la capacidad para inducir respuestas inmunitarias celular y humoral contra el antígeno CS del parásito *P. falciparum* en ratones. Además, se comparan las inmunogenicidades de los vectores de adenovirus que contienen CS de longitud completa y menos GPI. Este estudio incluye ratones B10.BR. Se inmunizan los animales mediante inyección intramuscular de 10^8 - 10^{10} pv de los vectores virales Ad5 Δ E3 o Ad35 Δ E3 que portan o bien el gen de CS de longitud completa (Ad5 Δ E3-CS.Pfalc y Ad35 Δ E3-CS.Pfalc) o bien el gen de CS menos la secuencia de anclaje GPI (Ad5 Δ E3-CS.Pfalc.(-28)/(-14) y Ad35 Δ E3-CS.Pfalc.(-28)/(-14) o sin transgén (Ad5 Δ E3-empty y Ad35 Δ E3-empty). A las dos semanas y de seis a ocho semanas tras la vacunación, se monitorizan las respuestas celular y humoral con ensayos inmunológicos bien conocidos por los expertos en la técnica tal como se describió anteriormente. Se programan la inmunización, la exposición y la lectura en la tabla IV y V.

Se espera que la inmunogenicidad de los vectores basados en Ad35 sea superior o al menos comparable a la inmunogenicidad desencadenada por los vectores basados en Ad5. La figura 6 muestra los resultados que se obtuvieron usando el vector basado en Ad5 que contenía el gen de longitud completa que codifica para la proteína CS de *P. falciparum*, el gen que codifica para la proteína con la delección de 14 aminoácidos y el gen que codifica para la proteína con la delección de 28 aminoácidos. Los resultados indican que los tres vectores (basados en Ad5) pueden inducir a la respuesta inmunitaria celular tal como se midió mediante el número de células que segregan IFN- γ específicas de CS en una población de esplenocitos, determinado por el ensayo ELISPOT *ex-vivo* descrito anteriormente, y generalmente como en Bruña-Romero *et al.* (2001a).

Ejemplo 7. Inducción de una protección duradera contra la infección por malaria de *P. yoelii* mediante regímenes de sensibilización-refuerzo con vacunas basadas en diferentes serotipos de adenovirus.

Se mostró que el serotipo 5 de adenovirus recombinante que expresa un antígeno CS de *P. yoelii* provoca protección cuando se usa en un régimen de sensibilización-refuerzo en combinación con un virus vaccinia recombinante que porta el mismo antígeno (Bruña-Romero *et al.* 2001a). Se diseñó un experimento para investigar la capacidad de los regímenes de sensibilización/refuerzo basados en vectores de adenovirus que portan CS con codones optimizados y derivados de dos serotipos diferentes para inducir protección duradera contra el antígeno CS de *P. yoelii*. Este estudio incluye ratones Balb/C distribuidos en grupos experimentales de 12 ratones cada uno. Se inmunizan los animales mediante inyección intramuscular de una dosis óptima de vectores virales Ad5 Δ E3 o Ad35 Δ E3 que portan o bien el gen de CS de *P. yoelii* (Ad5 Δ E3-CS.Pyoel y Ad35 Δ E3-CS.Pyoel) o bien no portan transgén (Ad5 Δ E3-empty y Ad35 Δ E3-empty). Se sensibiliza un grupo de animales en la semana 0 con Ad5 Δ E3-CS.Pyoel y se refuerza en la semana 8 con Ad35 Δ E3-CS.Pyoel. Se sensibiliza otro grupo de ratones en la semana 0 con Ad35 Δ E3-CS.Pyoel y se refuerza en la semana 8 con Ad5 Δ E3-CS.Pyoel. Se sensibilizan otros grupos de ratones en la semana 0 con Ad35 Δ E3-CS.Pyoel o Ad5 Δ E3-CS.Pyoel y se refuerzan en la semana 8 con el mismo vector. Finalmente, se sensibiliza un grupo control de ratones en la semana 0 con Ad5 Δ E3-empty y se refuerza en la semana 8 con Ad35 Δ E3-empty. En la semana 2 tras el refuerzo, se sacrifican 6 ratones de cada grupo para permitir la evaluación y caracterización de las respuestas inmunitarias celular y humoral con ensayos inmunológicos bien conocidos por los expertos en la técnica, se exponen los 6 ratones restantes de cada grupo con esporozoítos vivos. Se programan la inmunización, la exposición y la lectura en la tabla VI. Se monitorizará la protección contra la infección por malaria y se medirá usando ensayos bien conocidos por los expertos en la técnica tal como se

describió anteriormente. Se espera que los regímenes de vacunas basados en Ad35 solo o combinaciones Ad5/Ad35 sean superiores o al menos comparables en eficacia en comparación con los regímenes basados solamente en Ad5.

5 Ejemplo 8. Inducción de una inmunidad duradera contra la infección por malaria de *P. falciparum* mediante regímenes de sensibilización-refuerzo con vacunas basadas en diferentes serotipos de adenovirus.

Se diseñó un experimento para investigar la capacidad de los regímenes de sensibilización/refuerzo basados en vectores de adenovirus derivados de dos serotipos diferentes para inducir inmunidad duradera contra el antígeno CS de *P. falciparum*. El estudio incluye ratones B10.BR distribuidos en grupos experimentales de 24 ratones cada uno. Se inmunizan los animales mediante inyección intramuscular de una dosis óptima de vectores de adenovirus que portan o bien el gen de CS de longitud completa (Ad5ΔE3-CS.Pfalc y Ad35ΔE3-CS.Pfalc) o bien el gen de CS menos la secuencia de anclaje GPI (Ad5ΔE3-CS.Pfalc(-28)/(-14) y Ad35ΔE3-CS.Pfalc(-28)/(-14)) o no portan transgén (Ad5ΔE3-empty y Ad35ΔE3-empty). Se sensibiliza un grupo de animales en la semana 0 con Ad5ΔE3-CS.Pfalc o Ad5ΔE3-CS.Pfalc(-28)/(-14) y se refuerza en la semana 8 con Ad35ΔE3-CS.Pfalc o Ad35ΔE3-CS.Pfalc(-28)/(-14). Se sensibiliza otro grupo de ratones en la semana 0 con Ad35ΔE3-CS.Pfalc o Ad35ΔE3-CS.Pfalc(-28)/(-14) y se refuerza en la semana 8 con Ad5ΔE3-CS.Pfalc o Ad5ΔE3-CS.Pfalc(-28)/(-14). Se sensibiliza otro grupo de ratones en la semana 0 con Ad35ΔE3-CS.Pfalc o Ad35ΔE3-CS.Pfalc(-28)/(-14) y se refuerza en la semana 8 con el mismo vector. Finalmente, se sensibiliza un grupo control de ratones en la semana 0 con Ad5ΔE3-empty y se refuerza en la semana 8 con Ad35ΔE3-empty. En las semanas 2 y 6 ó 10 ó 16 tras el refuerzo, se sacrifican 6 ratones en cada punto de tiempo y se monitorizaron las respuestas celular y humoral con ensayos inmunológicos bien conocidos por los expertos en la técnica y tal como se describió anteriormente. Se programan la inmunización, la exposición y la lectura en la tabla VII. Se espera que los regímenes de vacunas basados en Ad35 sólo o combinaciones de Ad5/Ad35 sean superiores o al menos comparables en eficacia en comparación con regímenes basados solamente en Ad5.

30 Ejemplo 9. Inducción de una respuesta inmunitaria contra el antígeno CS de *P. falciparum* mediante regímenes de sensibilización/refuerzo usando vacunas basadas en diferentes serotipos de adenovirus en primates no humanos.

Se describe un ejemplo de un experimento útil para investigar la capacidad de los regímenes de sensibilización/refuerzo basados en vectores de adenovirus derivados de dos serotipos diferentes para provocar inmunidad contra el antígeno CS de *P. falciparum* en primates no humanos. Además, se evalúa el efecto de dos vías de administración diferentes de la vacuna, intramuscular e intradérmica.

Se vacunan monos Rhesus con vectores de adenovirus que portan o bien el gen de CS de longitud completa (Ad5ΔE3-CS.Pfalc o Ad35ΔE3-CS.Pfalc) o bien el gen de CS menos la secuencia de anclaje GPI (Ad5ΔE3-CS.Pfalc(pf-aa-sub) o Ad35ΔE3-CS.Pfalc(pf-aa-sub)). Se comparan los regímenes de sensibilización/refuerzo (Ad5 seguido por Ad35 o Ad35 seguido por Ad5) con regímenes de sensibilización/refuerzo generalmente aplicados (Ad5 seguido por Ad5 o Ad35 seguido por Ad35). Se monitorizan las respuestas inmunitarias celular y humoral usando ensayos inmunológicos bien conocidos por los expertos en la técnica. Se somete a prueba el suero de monos inmunizados mediante ensayo ELISA para determinar la naturaleza y magnitud de la respuesta de anticuerpos contra la región de repetición de CS. Se mide la respuesta inmunitaria celular mediante el ensayo ELISPOT para determinar la cantidad de células que segregan IFN-γ específicas de antígeno.

Tabla I. Nombres y números de entrada de la base de datos de Genbank de las secuencias de aminoácidos de circumsporozoíto de *P. falciparum* usadas para generar la secuencia consenso final.

Aislados de tipo medio	Números de entrada	Cepas de lab.	Números de entrada
China	AAG37074	3D7	CAA33421
Tailandia	CAB64171		CAB38998
	CSP_PLAFT		CSP_PLAFO
	4AA29542 - AAA29552		NP_473175
	AAA29555 - AAA29576	7GB	CSP_PLAFA
Brasil	CAB64167		C60657
	CAB64190 - CAB64197		9524
Senegal	CAB64180 - CAB64189	NF54	AAA29521
Myanmar	CAB64237 - CAB64243		AAA9527

Aislados de tipo medio	Números de entrada	Cepas de lab.	Números de entrada
India	AB64169		05428
Tanzania	AB64168		SP_PLAFL
	CAB64170 CAB64172	WELLCOME	A54529
			AAA29554
Gambia	AAF03134 - AAF03136		CSP_PLAFW
	A38869		D60657
	B60657	LES	CSP_PLAFL
	B38869		AAA57043
	H60657		B29785
Uganda	CAA27599		
	CAB64177		
Liberia	CAB64176		
Honduras	CAB64174		
Sureste de Asia	AAA29516 - AAA29519		
	CAB64175		
	CAB64178		
	CAB64179		

Tabla II. Programa de inmunización, exposición y lectura para las vacunaciones de ratones con Ad5.CS.Pyoel (Ad5-PyCS), pv = partículas virales por ratón.

Programa de inmunización	Vector viral	pv	n.º de ratones	ELISPOT/suero	Exposición
Sensibilización/exposición	Ad5-PyCS	10 ⁸	12	2 semanas (6 ratones)	2 semanas (6 ratones)
Sensibilización/exposición	Ad5-PyCS	10 ⁸	12	2 semanas (6 ratones)	2 semanas (6 ratones)
Sensibilización/exposición	Ad5-PyCS	10 ¹⁰	12	2 semanas (6 ratones)	2 semanas (6 ratones)
Sensibilización/exposición	Ad5-vacío	10 ¹⁰	8	2 semanas (4 ratones)	2 semanas (4 ratones)

5

Tabla III. Programa de inmunización, exposición y lectura para vacunaciones de ratones con Ad35.CS.Pyoel (Ad35-PyCS), pv = partículas virales por ratón.

Programa de inmunización	Vector viral	pv	n.º de ratones	ELISPOT/suero	Exposición
Sensibilización/exposición	Ad35-PyCS	10 ⁸	12	2 semanas (6 ratones)	2 semanas (6 ratones)
Sensibilización/exposición	M35-PyCS	10 ⁸	12	2 semanas (6 ratones)	2 semanas (6 ratones)
Sensibilización/exposición	Ad35-PyCS	10 ¹⁰	12	2 semanas (6 ratones)	2 semanas (6 ratones)
Sensibilización/exposición	Ad35-vacío	10 ¹⁰	8	2 semanas (4 ratones)	2 semanas (4 ratones)

10

Tabla IV. Programa de inmunización, exposición y lectura para vacunaciones de ratones con Ad5.CS.Pfalc (Ad5-PfCS, con o sin anclaje), pv = partículas virales por ratón.

Programa de inmunización	Vector viral	pv	n.º de ratones	ELISPOT/suero	ELISPOT/suero
Sensibilización	Ad5-PfCS	10 ⁸	12	2 semanas (6 ratones)	6-8 semanas (6 ratones)
Sensibilización	Ad5-PfCS	10 ⁸	12	2 semanas (6 ratones)	6-8 semanas (6 ratones)
Sensibilización	Ad5-PfCS	10 ¹⁰	12	2 semanas (6 ratones)	6-8 semanas (6 ratones)

Programa de inmunización	Vector viral	pv	n.º de ratones	ELISPOT/suero	ELISPOT/suero
Sensibilización	Ad5-vacío	10 ¹⁰	8	2 semanas (4 ratones)	6-8 semanas (4 ratones)

Tabla V. Programa de inmunización, exposición y lectura para vacunaciones de ratones con Ad35.CS.Pfalc (Ad35-PfCS, con o sin anclaje), pv = partículas virales por ratón.

Programa de inmunización	Vector viral	pv	n.º de ratones	ELISPOT/suero	ELISPOT/suero
Sensibilización	Ad35-PfCS	10 ⁸	12	2 semanas (6 ratones)	6-8 semanas (6 ratones)
Sensibilización	Ad35-PfCS	10 ⁸	12	2 semanas (6 ratones)	6-8 semanas (6 ratones)
Sensibilización	Ad35-PfCS	10 ¹⁰	12	2 semanas (6 ratones)	6-8 semanas (6 ratones)
Sensibilización	Ad35-vacío	10 ¹⁰	8	2 semanas (4 ratones)	6-8 semanas (4 ratones)

5

Tabla VI. Programa de inmunización, exposición y lectura para ratones en un sistema de vacunación de sensibilización-refuerzo usando Ad5.CS.Pyoel (Ad5-PyCS) y Ad35.CS.Pyoel (Ad35-PyCS).

Programa de inmunización	Vector viral-sensibilización	Vector viral-refuerzo (tras 8 semanas)	n.º de ratones	ELISPOT/suero	exposición
Sensibilización-refuerzo/exposición	Ad5-PyCS	Ad5-PyCS	12	2 semanas tras el refuerzo (6 ratones)	2 semanas tras el refuerzo (6 ratones)
Sensibilización-refuerzo/exposición	Ad35-PyCS	Ad35-PyCS	12	2 semanas tras el refuerzo (6 ratones)	2 semanas tras el refuerzo (6 ratones)
Sensibilización-refuerzo/exposición	Ad5-PyCS	Ad35-PyCS	12	2 semanas tras el refuerzo (6 ratones)	2 semanas tras el refuerzo (6 ratones)
Sensibilización-refuerzo/exposición	Ad35-PyCS	Ad5-PyCS	12	2 semanas tras el refuerzo (6 ratones)	2 semanas tras el refuerzo (6 ratones)
Sensibilización-refuerzo/exposición	Ad5- vacío	Ad35- vacío	12	2 semanas tras el refuerzo (6 ratones)	2 semanas tras el refuerzo (6 ratones)

10

Tabla VII. Programa de inmunización, exposición y lectura para ratones en un sistema de vacunación de sensibilización-refuerzo usando Ad5.CS.Pfalc (Ad5-PfCS) y Ad35.CS.Pfalc (Ad35-PfCS), con o sin anclaje GPI.

Programa de inmunización	Vector viral-sensibilización	Vector viral-refuerzo (tras 8 semanas)	n.º de ratones	ELISPOT/suero	ELISPOT/suero
Sensibilización-refuerzo/exposición	Ad5-PfCS	Ad5-PfCS	12	2 semanas tras el refuerzo (6 ratones)	6/10/16 semanas tras el refuerzo (6 ratones)
Sensibilización-refuerzo/exposición	Ad35-PfCS	Ad35-PfCS	12	2 semanas tras el refuerzo (6 ratones)	2 semanas tras el refuerzo (6 ratones)
Sensibilización-refuerzo/exposición	Ad5-PfCS	Ad35-PfCS	12	2 semanas tras el refuerzo (6 ratones)	2 semanas tras el refuerzo (6 ratones)
Sensibilización-refuerzo/exposición	Ad35-PfCS	Ad5-PfCS	12	2 semanas tras el refuerzo (6 ratones)	2 semanas tras el refuerzo (6 ratones)
Sensibilización-refuerzo/exposición	Ad5- vacío	Ad35- vacío	12	2 semanas tras el refuerzo (6 ratones)	2 semanas tras el refuerzo (6 ratones)

15

Bibliografía

Bruña-Romero O, Gonzalez-Aseguinolaza G, Hafalla JCR, *et al.* (2001a) 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 USA 98:11491-11496

- 5 Bruña-Romero O, Hafalla JC, Gonzalez-Aseguinolaza G, sano G, Tsui M, Zavala F. (2001b) Detection of malaria liver-stages in mice infected through the bite of a single Anopheles mosquito using a highly sensitive real-time PCR. *Int J Parasitol* 31:1499-1502
- Clyde DF, Most H, McCarthy VC, Vanderberg JP. (1973) Immunization of men against sporozoite-induced falciparum malaria. *Am J Med Sci* 266:169-177
- 10 De Jong JC, Wermenbol AG, Verweij-Uijterwaal MW, Slaterus KW, Wertheim-Van Dillen P, Van Doornum GJ, Khoo SH, Hierholzer JC. (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
- 15 Gandon S, Mackinnon MJ, Nee S, Read AF. (2001) Imperfect vaccines and the evolution of pathogen virulence. *Nature* 414:751-756
- Gilbert SC, Schneider J, Hannan CM, *et al.* (2002) Enhanced CD8 T cell immunogenicity and protective efficacy in a mouse malaria model using a recombinant adenoviral vaccine in heterologous prime-boost immunisation regimes. *Vaccine* 20:1039-1045
- 20 Gordon DM, McGovern TW, Krzych U, Cohen JC, Schneider I, LaChance R, Heppner DG, Yuan G, Hollingdale M, Slaoui M *et al.* (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
- 25 Kurtis JD, Hollingdale MR, Luty AJF, Lanar DE, Krzych U and Duffy PE (2001) Pre-erythrocytic immunity to *Plasmodium falciparum*: the case for an LSA-1 vaccine. *Trends in Parasitology* 17:219-223
- Lockyer MJ, Marsh K, Newbold CI. (1989) Wild isolates of *Plasmodium falciparum* show extensive polymorphism in T cell epitopes of the circumsporozoite protein. *Mol Biochem Parasitol* 37:275-280
- 30 Miyahara Y. *et al* (1998). Recombinant viruses expressing a human malaria antigen can elicit potentially protective immune CD8+ responses in mice. *PNAS* 95 (7): 3954-3959
- 35 Moran P and Caras IW. (1994) Requirements for glycosylphosphatidylinositol attachment are similar but not identical in mammalian cells and parasitic protozoa. *J Cell Biol* 125:333-343
- Nagata T, *et al* (1999). Codon optimization effect on translational efficiency of ADN vaccine in mammalian cells: analysis of plasmid ADN encoding a CTL epitope derived from microorganisms. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 261: 445-451
- 40 Nardin EH, Calvo-Calle JM, Oliveira GA, *et al.* (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
- 45 Narum DL, Kumar S, Rogers WO, *et al.* (2001) Codon optimization of gene fragments encoding *Plasmodium falciparum* merzoite proteins enhances ADN vaccine protein expression and immunogenicity in mice. *Infect and Immun* 69:7250-7253
- 50 Nussenzweig RS, Vanderberg J, Most H, Orton C. (1967) Protective immunity produced by the injection of X-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature* 216:160-162
- Romero P, Marayanski JL, Corradin G, *et al.* (1989) Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria. *Nature* 341:323-326
- 55 Rodrigues EG, Zavala F, Eichinger D, *et al.* (1997) Single immunizing dose of recombinant adenovirus efficiently induces CD8+ T cell-mediated protective immunity against malaria. *J Immunol* 158:1268-1274
- 60 Scheibelhofer S, Chen D, Weiss R, *et al.* (2001) Removal of the circumsporozoite protein (CSP) glycosylphosphatidylinositol signal sequence from a CSP ADN vaccine enhances induction of CSP-specific Th2 type immune responses and improves protection against malaria infection. *Eur J Immunol* 31:692-698
- Zevering Y, Khamboonruang C, Good MF. (1994) Effect of polymorphism of sporozoite antigens on T-cell activation. *Res Immunol* 145:469-476
- 65 **Lista de secuencias**

- <110> Crucell Holland B.V.
 Crucell Holland B.V.
 Pau, Maria Grazia
 Stegmann, Antonius J.H.
 5 Kaspers, Jorn
 Holterman, Lennart
- <120> Vacunas contra la malaria basadas en virus recombinante
- 10 <130> 0084WO00ORD
- <140> Documento PCT/EP03/xxxxx
 <141> 17-12-2003
- 15 <150> Documento EP 02102781.8
 <151> 17-12-2002
- <150> Documento PCT/EP03/50222
 <151> 12-06-2003
- 20 <160> 19
- <170> PatentIn versión 3.1
- 25 <210> 1
 <211> 1193
 <212> ADN
 <213> Artificial
- 30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: gen de circumsporozoíto con codones optimizados de *Plasmodium falciparum*, clon 02-148
- <220>
 35 <221> CDS
 <222> (13) .. (1170)
 <223>
- <220>
 40 <221> péptido_sig
 <222> (13) .. (102)
 <223>
- 45 <400> 1

```

aagcttgcca cc atg atg agg aaa ctg gcc atc ctg agc gtg agc agc ttc      51
          Met Met Arg Lys Leu Ala Ile Leu Ser Val Ser Ser Phe
            1                    5                    10

ctg ttc gtg gag gcc ctg ttt cag gag tac cag tgc tac ggc agc agc      99
Leu Phe Val Glu Ala Leu Phe Gln Glu Tyr Gln Cys Tyr Gly Ser Ser
  15                    20                    25

agc aac acc cgg gtg ctg aac gag ctg aac tac gac aac gcc ggc acc      147
Ser Asn Thr Arg Val Leu Asn Glu Leu Asn Tyr Asp Asn Ala Gly Thr
  30                    35                    40                    45

aac ctg tac aac gag ctg gag atg aac tac tac ggc aag cag gag aac      195
Asn Leu Tyr Asn Glu Leu Glu Met Asn Tyr Tyr Gly Lys Gln Glu Asn
  50                    55                    60

tgg tac agc ctg aag aag aac agc cgg tct ctg ggc gag aac gac gac      243
Trp Tyr Ser Leu Lys Lys Asn Ser Arg Ser Leu Gly Glu Asn Asp Asp
  65                    70                    75
    
```

ES 2 377 964 T3

ggc aac aac aac aac ggc gac aac ggc cgg gag ggc aag gac gag gac 291
 Gly Asn Asn Asn Asn Gly Asp Asn Gly Arg Glu Gly Lys Asp Glu Asp
 80 85 90

aag cgg gac ggc aac aac gag gac aac gag aag ctg cgg aag ccc aag 339
 Lys Arg Asp Gly Asn Asn Glu Asp Asn Glu Lys Leu Arg Lys Pro Lys
 95 100 105

cac aag aaa ctt aag cag ccc gcc gac ggc aac ccc gac ccc aac gcc 387
 His Lys Lys Leu Lys Gln Pro Ala Asp Gly Asn Pro Asp Pro Asn Ala
 110 115 120 125

aac ccc aac gtg gac ccc aac gcc aat cct aat gtc gac ccc aat gcc 435
 Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val As p Pro Asn Ala
 130 135 140

aat ccg aac gtt gat ccc aat gcg aat cct aac gct aac ccc aat gcc 483
 Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
 145 150 155

aac cca aat gcc aat cca aat gca aat ccc aac gcc aat cca aac gca 531
 Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
 160 165 170

aac cct aat gct aat cca aac gct aat cct aat gcc aat ccc aat gct 579
 Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
 175 180 185

aac cca aac gtc gat cct aac gca aat ccg aac gct aac ccc aac gca 627
 Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
 190 195 200 205

aat ccc aac gct aac ccg aac gca aac cct aac gcc aat ccg aat gcc 675
 Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
 210 215 220

aac cca aac gcc aac ccg aac gct aat ccg aat gct aac ccg aat gct 723
 Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
 225 230 235

aat cct aac gca aac cca aat gca aac ccc aat gca aac ccg aac gcc 771
 Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala
 240 245 250

aat ccc aac gcc aat cct aat gcc aac aag aac aat cag ggc aac ggc 819
 Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Lys Asn Asn Gln Gly Asn Gly
 255 260 265

cag ggc cac aac atg ccc aac gac ccc aac cgg aac gtg gac gag aac 867
 Gln Gly His Asn Met Pro Asn Asp Pro Asn Arg Asn Val Asp Glu Asn
 270 275 280 285

gcc aac gcc aac aac gcc gtg aag aac aac aac aac gag gag ccc agc 915
 Ala Asn Ala Asn Asn Ala Val Lys Asn Asn Asn Asn Glu Glu Pro Ser
 290 295 300

gac aag cac atc gag cag tac ctg aag aag atc cag aac agc ctg agc 963
 Asp Lys His Ile Glu Gln Tyr Leu Lys Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser
 305 310 315

acc gag tgg agc ccc tgc agc gtg acc tgc ggc aac ggc att cag gtg 1011
 Thr Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val
 320 325 330

cgg atc aag ccc ggc agc gcc aac aag ccc aag gac gag ctg gac tac 1059
 Arg Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr
 335 340 345

gag aat gac atc gag aag aag atc tgc aag atg gag aag tgc agc agc 1107
 Glu Asn Asp Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys Me t Glu Lys Cys Ser Ser
 350 355 360 365

gtg ttc aac gtg gtg aac agc gcc atc ggc ctg att atg gtg ctg agc 1155
 Val Phe Asn Val Val Asn Ser Ala Ile Gly Leu Ile Met Val Leu Ser
 370 375 380

ttc ctg ttc ctg aac tgaagatctg ctgataagga tcc 1193
 Phe Leu Phe Leu Asn
 385

ES 2 377 964 T3

<210> 2
 <211> 386
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: gen de circumsporozoíto con codones optimizados de *Plasmodium falciparum*, clon 02-148

10 <400> 2

```

Met Met Arg Lys Leu Ala Ile Leu Ser Val Ser Ser Phe Leu Phe Val
 1                               10                               15
Glu Ala Leu Phe Gln Glu Tyr Gln Cys Tyr Gly Ser Ser Ser Asn Thr
 20                               25                               30
Arg Val Leu Asn Glu Leu Asn Tyr Asp Asn Ala Gly Thr Asn Leu Tyr
 35                               40                               45
Asn Glu Leu Glu Met Asn Tyr Tyr Gly Lys Gln Glu Asn Trp Tyr Ser
 50                               55                               60
Leu Lys Lys Asn Ser Arg Ser Leu Gly Glu Asn Asp Asp Gly Asn Asn
 65                               70                               75                               80
Asn Asn Gly Asp Asn Gly Arg Glu Gly Lys Asp Glu Asp Lys Arg Asp
 85                               90                               95
Gly Asn Asn Glu Asp Asn Glu Lys Leu Arg Lys Pro Lys His Lys Lys
 100                              105                              110
Leu Lys Gln Pro Ala Asp Gly Asn Pro Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 115                              120                              125
Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 130                              135                              140
Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 145                              150                              155                              160
Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 165                              170                              175
  
```

ES 2 377 964 T3

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 180 185 190

Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 195 200 205

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 210 215 220

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 225 230 235 240

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 245 250 255

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Lys Asn Asn Gln Gly Asn Gly Gln Gly His
 260 265 270

Asn Met Pro Asn Asp Pro Asn Arg Asn Val Asp Glu Asn Ala Asn Ala
 275 280 285

Asn Asn Ala Val Lys Asn Asn Asn Asn Glu Glu Pro Ser Asp Lys His
 290 295 300

Ile Glu Gln Tyr Leu Lys Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp
 305 310 315 320

Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg Ile Lys
 325 330 335

Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr Glu Asn Asp
 340 345 350

Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met Glu Lys Cys Ser Ser Val Phe Asn
 355 360 365

Val Val Asn Ser Ala Ile Gly Leu Ile Met Val Leu Ser Phe Leu Phe
 370 375 380

Leu Asn 385

- 5 <210> 3
 <211> 386
 <212> PRT
 <213> *Plasmodium falciparum*
- 10 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1) .. (30)
 <223>
- 15 <220>
 <221> REPETICIÓN
 <222> (124) .. (259)
 <223> Región de 4 N VDP y en total 30 repeticiones NAVP
- 20 <220>
 <221> LÍPIDO
 <222> (359) .. (386)
 <223> ANCLAJE GPI
- 25 <220>
 <221> MUTAGEN
 <222> (373) .. (373)
 <223> sustitución de Ser por Ala, eliminación de sitio de glicosilación
- 30 <400> 3

ES 2 377 964 T3

Met Met Arg Lys Leu Ala Ile Leu Ser Val Ser Ser Phe Leu Phe Val
 1 5 10 15

Glu Ala Leu Phe Gln Glu Tyr Gln Cys Tyr Gly Ser Ser Ser Asn Thr
 20 25 30

Arg Val Leu Asn Glu Leu Asn Tyr Asp Asn Ala Gly Thr Asn Leu Tyr
 35 40 45

Asn Glu Leu Glu Met Asn Tyr Tyr Gly Lys Gln Glu Asn Trp Tyr Ser
 50 55 60

Leu Lys Lys Asn Ser Arg Ser Leu Gly Glu Asn Asp Asp Gly Asn Asn
 65 70 75 80

Asn Asn Gly Asp Asn Gly Arg Glu Gly Lys Asp Glu Asp Lys Arg Asp
 85 90 95

Gly Asn Asn Glu Asp Asn Glu Lys Leu Arg Lys Pro Lys His Lys Lys
 100 105 110

Leu Lys Gln Pro Ala Asp Gly Asn Pro Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 115 120 125

Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 130 135 140

Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 145 150 155 160

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 165 170 175

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 180 185 190

Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 195 200 205

ES 2 377 964 T3

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 210 215 220

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 225 230 235 240

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 245 250 255

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Lys Asn Asn Gln Gly Asn Gly Gln Gly His
 260 265 270

Asn Met Pro Asn Asp Pro Asn Arg Asn Val Asp Glu Asn Ala Asn Ala
 275 280 285

Asn Asn Ala Val Lys Asn Asn Asn Asn Glu Glu Pro Ser Asp Lys His
 290 295 300

Ile Glu Gln Tyr Leu Lys Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp
 305 310 315 320

Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg Ile Lys
 325 330 335

Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr Glu Asn Asp
 340 345 350

Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met Glu Lys Cys Ser Ser Val Phe Asn
 355 360 365

Val Val Asn Ser Ala Ile Gly Leu Ile Met Val Leu Ser Phe Leu Phe
 370 375 380

Leu Asn
 385

- <210> 4
- <211> 1154
- 5 <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> Descripción de secuencia artificial: gen de circumsporozoíto con codones optimizados de *Plasmodium falciparum* cepa 3D7, clon 02-659
- <220>
- <221> CDS
- 15 <222> (13) .. (1128)
- <223>
- <220>
- <221> péptido_sig
- 20 <222> (13) .. (102)
- <223>
- <400> 4

ES 2 377 964 T3

aagcttgcca cc atg atg agg aaa ctg gcc atc ctg agc gtg agc agc ttc	51
Met Met Arg Lys Leu Ala Ile Leu Ser Val Ser Ser Phe	
1 5 10	
ctg ttc gtg gag gcc ctg ttt cag gag tac cag tgc tac ggc agc agc	99
Leu Phe Val Glu Ala Leu Phe Gln Glu Tyr Gln Cys Tyr Gly Ser Ser	
15 20 25	
agc aac acc cgg gtg ctg aac gag ctg aac tac gac aac gcc ggc acc	147
Ser Asn Thr Arg Val Leu Asn Glu Leu Asn Tyr Asp Asn Ala Gly Thr	
30 35 40 45	
aac ctg tac aac gag ctg gag atg aac tac tac ggc aag cag gag aac	195
Asn Leu Tyr Asn Glu Leu Glu Met Asn Tyr Tyr Gly Lys Gln Glu Asn	
50 55 60	
tgg tac agc ctg aag aa g aac agc cgg tct ctg ggc gag aac gac gac	243
Trp Tyr Ser Leu Lys Lys Asn Ser Arg Ser Leu Gly Glu Asn Asp Asp	
65 70 75	
ggc aac aac aac aac ggc gac aac ggc cgg gag ggc aag gac ga g gac	291
Gly Asn Asn Asn Asn Gly Asp Asn Gly Arg Glu Gly Lys Asp Glu Asp	
80 85 90	
aag cgg gac ggc aac aac gag gac aac gag aag ctg cgg aag ccc aag	339
Lys Arg Asp Gly Asn Asn Glu Asp Asn Glu Lys Leu Arg Lys Pro Lys	
95 100 105	
cac aag aaa ctt aag cag ccc gcc gac ggc aac ccc gac ccc aac gcc	387
His Lys Lys Leu Lys Gln Pro Ala Asp Gly Asn Pro Asp Pro A sn Ala	
110 115 120 125	
aac ccc aac gtg gac ccc aac gcc aat cct aat gtc gac ccc aat gcc	435
Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala	
130 135 140	
aat ccg aac gtt gat ccc aat gcg aat cct aac gct aac ccc aat gcc	483
Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala	
145 150 155	
aac cca aat gcc aat cca aat gca aat ccc aac gcc aat cca aac gca	531
Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala	
160 165 170	
aac cct aat gct aat cca aac gct aat cct aat gcc aat ccc aat gct	579
Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala	
175 180 185	
aac cca aac gtc gat cct aac gca aat ccg aac gct aac cc c aac gca	627
Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala	
190 195 200 205	
aat ccc aac gct aac ccg aac gca aac cct aac gcc aat ccg aat gcc	675
Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala	
210 215 220	
aac cca aac gcc aac ccg aac gct aat ccg aat gct aac ccg aat gct	723
Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn P ro Asn Ala	
225 230 235	
aat cct aac gca aac cca aat gca aac ccc aat gca aac ccg aac gcc	771
Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala	
240 245 250	

ES 2 377 964 T3

```

aat ccc aac gcc aat cct aat gcc aac aag aac aat cag gcc aac ggc      819
Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Lys Asn Asn Gln Gly Asn Gly
255                260                265

cag gcc cac aac atg ccc aac gac ccc aac cgg aac gtg gac gag aac      867
Gln Gly His Asn Met Pro Asn Asp Pro Asn Arg Asn Val Asp Glu Asn
270                275                280                285

gcc aac gcc aac agc gcc gtg aag aac aac aac aac gag gag ccc agc      915
Ala Asn Ala Asn Ser Ala Val Lys Asn Asn Asn Asn Glu Glu Pro Ser
290                295                300

gac aag cac atc aag gag tac ctg aac aag atc cag aac agc ctg agc      963
Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser
305                310                315

acc gag tgg agc ccc tgc agc gtg acc tgc gcc aac ggc att cag gtg      1011
Thr Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val
320                325                330

cgg atc aag ccc gcc agc gcc aac aag ccc aag gac gag ctg gac tac      1059
Arg Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr
335                340                345

gcc aat gac atc gag aag aag atc tgc aag atg gag aag tgc agc agc      1107
Ala Asn Asp Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met Glu Lys Cys Ser Ser
350                355                360                365

gtg ttc aac gtg gtg aac tcc tgataaagat ctgctgataa ggatcc      1154
Val Phe Asn Val Val Asn Ser
370

```

<210> 5
 <211> 372
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Gen de circumsporozoíto con codones optimizados de *Plasmodium falciparum* cepa 3D7, clon 02-659

<400> 5

```

Met Met Arg Lys Leu Ala Ile Leu Ser Val Ser Ser Phe Leu Phe Val
1      .      5      10      15

Glu Ala Leu Phe Gln Glu Tyr Gln Cys Tyr Gly Ser Ser Ser Asn Thr
20      25      30

Arg Val Leu Asn Glu Leu Asn Tyr Asp Asn Ala Gly Thr Asn Leu Tyr
35      40      45

Asn Glu Leu Glu Met Asn Tyr Tyr Gly Lys Gln Glu Asn Trp Tyr Ser
50      55      60

Leu Lys Lys Asn Ser Arg Ser Leu Gly Glu Asn Asp Asp Gly Asn Asn
65      70      75      80

Asn Asn Gly Asp Asn Gly Arg Glu Gly Lys Asp Glu Asp Lys Arg Asp
85      90      95

```

ES 2 377 964 T3

Gly Asn Asn Glu Asp Asn Glu Lys Leu Arg Lys Pro Lys His Lys Lys
 100 105 110

Leu Lys Gln Pro Ala Asp Gly Asn Pro Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 115 120 125

Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 130 135 140

Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 145 150 155 160

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 165 170 175

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 180 185 190

Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 195 200 205

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 210 215 220

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 225 230 235 240

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 245 250 255

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Lys Asn Asn Gln Gly Asn Gly Gln Gly His
 260 265 270

Asn Met Pro Asn Asp Pro Asn Arg Asn Val Asp Glu Asn Ala Asn Ala
 275 280 285

Asn Ser Ala Val Lys Asn Asn Asn Asn Glu Glu Pro Ser Asp Lys His
 290 295 300

Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp
 305 310 315 320

Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg Ile Lys
 325 330 335

Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr Ala Asn Asp
 340 345 350

Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met Glu Lys Cys Ser Ser Val Phe Asn
 355 360 365

Val Val Asn Ser
 370

- 5 <210> 6
- <211> 372
- <212> PRT
- <213> *Plasmodium falciparum*

- 10 <220>
- <221> SEÑAL
- <222> (1) .. (30)
- <223>

- 15 <220>
- <221> REPETICIÓN
- <222> (124) .. (259)
- <223> Región de 4 NVDP y en total 30 repeticiones NAVP

<220>

ES 2 377 964 T3

<221> LÍPIDO
 <222> (359) .. (372)
 <223> ANCLAJE GPI

5 <400> 6

```

Met Met Arg Lys Leu Ala Ile Leu Ser Val Ser Ser Phe Leu Phe Val
1          5          10
Glu Ala Leu Phe Gln Glu Tyr Gln Cys Tyr Gly Ser Ser Ser Asn Thr
20          25          30
Arg Val Leu Asn Glu Leu Asn Tyr Asp Asn Ala Gly Thr Asn Leu Tyr
35          40          45
Asn Glu Leu Glu Met Asn Tyr Tyr Gly Lys Gln Glu Asn Trp Tyr Ser
50          55          60
Leu Lys Lys Asn Ser Arg Ser Leu Gly Glu Asn Asp Asp Gly Asn Asn
65          70          75          80
Asn Asn Gly Asp Asn Gly Arg Glu Gly Lys Asp Glu Asp Lys Arg Asp
85          90          95
Gly Asn Asn Glu Asp Asn Glu Lys Leu Arg Lys Pro Lys His Lys Lys
100         105         110
Leu Lys Gln Pro Ala Asp Gly Asn Pro Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn
115         120         125
Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn
130         135         140
Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
145         150         155         160
    
```

ES 2 377 964 T3

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 165 170 175

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 180 185 190

Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 195 200 205

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 210 215 220

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 225 230 235 240

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn
 245 250 255

Ala Asn Pro Asn Ala Asn Lys Asn Asn Gln Gly Asn Gly Gln Gly His
 260 265 270

Asn Met Pro Asn Asp Pro Asn Arg Asn Val Asp Glu Asn Ala Asn Ala
 275 280 285

Asn Ser Ala Val Lys Asn Asn Asn Asn Glu Glu Pro Ser Asp Lys His
 290 295 300

Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Gl u Trp
 305 310 315 320

Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg Ile Lys
 325 330 335

Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Ty r Ala Asn Asp
 340 345 350

Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met Glu Lys Cys Ser Ser Val Phe Asn
 355 360 365

Val Val Asn Ser
 370

5 <210> 7
 <211> 1115
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Gen de circumsporozoíto con codones optimizados de *Plasmodium yoelii*, clon 02-149

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (17) .. (1084)
 <223>

20 <220>
 <221> péptido_sig
 <222> (17) .. (73)
 <223>

<400> 7

ES 2 377 964 T3

aagcttgcta gccacc atg aag aag tgc acc atc ctg gtg gtg gcc agc ctg 52
Met Lys Lys Cys Thr Ile Leu Val Val Ala Ser Leu
1 5 10

ctg ctg gtg gac agc ctg ctg ccc ggc tac ggc cag aac aag agc gtg 100
Leu Leu Val Asp Ser Leu Leu Pro Gly Tyr Gly Gln Asn Lys Ser Val
15 20 25

cag gcc cag cgg aac ctg aac gag ctg tgc tac aac gag gag aac gac 148
Gln Ala Gln Arg Asn Leu Asn Glu Leu Cys Tyr Asn Glu Glu Asn Asp
30 35 40

aac aag ctg tac cac gtg ctg aac agc aag aac ggc aag att tac aac 196
Asn Lys Leu Tyr His Val Leu Asn Ser Lys Asn Gly Lys Ile Tyr Asn
45 50 55 60

cgg aac atc gtg aac cgg ctg ctg ggc gac gcc ctg aac ggc aag ccc 244
Arg Asn Ile Val Asn Arg Leu Leu Gly Asp Ala Leu Asn Gly Lys Pro
65 70 75

gag gag aag aag gac gac ccc ccc aag gac ggc aac aag gac gac ctg 292
Glu Glu Lys Lys Asp Asp Pro Pro Lys Asp Gly Asn Lys Asp Asp Leu
80 85 90

ccc aag gag gag aag aaa gac gat ctg cct aag gag gaa aaa aag gac 340
Pro Lys Glu Glu Lys Lys Asp Asp Leu Pro Lys Glu Glu Lys Lys Asp
95 100 105

gat cct cct aag gac ccc aag aag gac gat cct ccc aaa gag gcc cag 388
Asp Pro Pro Lys Asp Pro Lys Lys Asp Asp Pro Pro Lys Glu Ala Gln
110 115 120

aac aag ctg aac cag ccc gtg gtg gcc gac gag aac gtg gac cag gcc 436
Asn Lys Leu Asn Gln Pro Val Val Ala Asp Glu Asn Val Asp Gln Gly
125 130 135 140

cct ggc gcc cct cag ggc ccc ggg gcc cct cag ggc cct gga gcc cct 484
Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro
145 150 155

caa gga ccc gga gcc ccc cag gga cct ggc gct cct cag gga ccc gcc 532
Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly
160 165 170

gct cca cag ggc cca ggg gcc ccc cag ggc cca ggg gca ccc cag ggc 580
Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly
175 180 185

cca ggc gcc cca caa ggt ccc ggg gct cct cag ggt ccc gga gca cct 628
Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro
190 195 200

cag ggg cct gga gca cca cag ggg cct ggg gcc cca caa ggg cca ggc 676
Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly
205 210 215 220

gct ccc caa ggg cct ggc gca ccc cag gag ccc ccc cag cag ccc cct 724
Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Glu Pro Pro Gln Gln Pro Pro
225 230 235

cag cag ccc ccc cag caa cct ccc caa cag cct ccc cag caa cca cca 772
Gln Gln Pro Pro Gln Gln Pro Pro Gln Gln Pro Pro Gln Gln Pro Pro
240 245 250

cag cag cca cca cag caa ccc agg ccc cag ccc gac ggc aac aac aac 820
Gln Gln Pro Pro Gln Gln Pro Arg Pro Gln Pro Asp Gly Asn Asn Asn
255 260 265

aac aat aac aac aac ggc aac aac aac gag gac agc tac gtg ccc agc 868
Asn Asn Asn Asn Asn Gly Asn Asn Asn Glu Asp Ser Tyr Val Pro Ser
270 275 280

gcc gag cag atc ctg gag ttc gtg aag cag atc agc agc caa ctg acc 916
Ala Glu Gln Ile Leu Glu Phe Val Lys Gln Ile Ser Ser Gln Leu Thr
285 290 295 300

gag gag tdg agc cag tgc agc gtg acc tgc ggc agc ggc gtg cgg gtg 964
Glu Glu Trp Ser Gln Cys Ser Val Thr Cys Gly Ser Gly Val Arg Val
305 310 315

cgg aag cgg aag aac gtg aac aag cag ccc gag aac ctg acc ctg gag 1012
Arg Lys Arg Lys Asn Val Asn Lys Gln Pro Glu Asn Leu Thr Leu Glu
320 325 330

gac atc gac acc gag atc tgc aag atg gac aag tgc agc agc atc ttc 1060
Asp Ile Asp Thr Glu Ile Cys Lys Met Asp Lys Cys Ser Ser Ile Phe
335 340 345

aac atc gtg agc aac agc ctg ggc tgaagatctg ctgataagtt taacggatc 1114
Asn Ile Val Ser Asn Ser Leu Gly
350 355

c 1115

ES 2 377 964 T3

<210> 8
<211> 356
<212> PRT
5 <213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Gen de circumsporozoíto con codones optimizados de *Plasmodium yoelii*,
clon 02-149

10

<400> 8

```
Met Lys Lys Cys Thr I le Leu Val Val Ala Ser Leu Leu Leu Val Asp  
1          5          10          15  
Ser Leu Leu Pro Gly Tyr Gly Gln Asn Lys Ser Val Gln Ala Gln Arg  
20          25          30  
Asn Leu Asn Glu Leu Cys Tyr Asn Glu Glu Asn Asp Asn Lys Leu Tyr  
35          40          45  
His Val Leu Asn Ser Lys Asn Gly Lys Ile Tyr Asn Arg Asn Ile Val  
50          55          60  
Asn Arg Leu Leu Gly Asp Ala Leu Asn Gly Lys Pro Glu Glu Lys Lys  
65          70          75          80  
Asp Asp Pro Pro Lys Asp Gly Asn Lys Asp Asp Leu Pro Lys Glu Glu  
85          90          95
```

Lys Lys Asp Asp Leu Pro Lys Glu Glu Lys Lys Asp Asp Pro Pro Lys
 100 105 110

Asp Pro Lys Lys Asp Asp Pro Pro Lys Glu Ala Gln Asn Lys Leu Asn
 115 120 125

Gln Pro Val Val Ala Asp Glu Asn Val Asp Gln Gly Pro Gly Ala Pro
 130 135 140

Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly
 145 150 155 160

Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly
 165 170 175

Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro
 180 185 190

Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly
 195 200 205

Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly
 210 215 220

Pro Gly Ala Pro Gln Glu Pro Pro Gln Gln Pro Pro Gln Gln Pro Pro
 225 230 235 240

Gln Gln Pro Pro Gln Gln Pro Pro Gln Gln Pro Pro Gln Gln Pro Pro
 245 250 255

Gln Gln Pro Arg Pro Gln Pro Asp Gly Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn
 260 265 270

Asn Gly Asn Asn Asn Glu Asp Ser Tyr Val Pro Ser Ala Glu Gln Ile
 275 280 285

Leu Glu Phe Val Lys Gln Ile Ser Ser Gln Leu Thr Glu Glu Trp Ser
 290 295 300

Gln Cys Ser Val Thr Cys Gly Ser Gly Val Arg Val Arg Lys Arg Lys
 305 310 315 320

Asn Val Asn Lys Gln Pro Glu Asn Leu Thr Leu Glu Asp Ile Asp Thr
 325 330 335

Glu Ile Cys Lys Met Asp Lys Cys Ser Ser Ile Phe Asn Ile Val Ser
 340 345 350

Asn Ser Leu Gly
 355

- <210> 9
- <211> 356
- 5 <212> PRT
- <213> *Plasmodium yoelii*

- <220>
- <221> SEÑAL
- 10 <222> (1)..(19)
- <223>

- <220>
- <221> REPETICIÓN
- 15 <222> (138) .. (225)
- <223> Región de 15 repeticiones QGPGAP

- <220>
- <221> REPETICIÓN
- 20 <222> (229) .. (254)

ES 2 377 964 T3

<223> Región de 7 repeticiones PQQP

<400> 9

```

Met Lys Lys Cys Thr Ile Leu Val Val Ala Ser Leu Leu Leu Val Asp
 1           5           10           15

Ser Leu Leu Pro Gly Tyr Gly Gln Asn Lys Ser Val Gln Ala Gln Arg
 20           25           30

Asn Leu Asn Glu Leu Cys Tyr Asn Glu Glu Asn Asp Asn Lys Leu Tyr
 35           40           45

His Val Leu Asn Ser Lys Asn Gly Lys Ile Tyr Asn Arg Asn Ile Val
 50           55           60

Asn Arg Leu Leu Gly Asp Ala Leu Asn Gly Lys Pro Glu Glu Lys Lys
 65           70           75           80

Asp Asp Pro Pro Lys Asp Gly Asn Lys Asp Asp Leu Pro Lys Glu Glu
 85           90           95

Lys Lys Asp Asp Leu Pro Lys Glu Glu Lys Lys Asp Asp Pro Pro Lys
 100          105          110

Asp Pro Lys Lys Asp Asp Pro Pro Lys Glu Ala Gln Asn Lys Leu Asn
 115          120          125

Gln Pro Val Val Ala Asp Glu Asn Val Asp Gln Gly Pro Gly Ala Pro
 130          135          140

Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly
 145          150          155          160

Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly
 165          170          175
    
```

ES 2 377 964 T3

Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro
 180 185 190

Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly
 195 200 205

Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly
 210 215 220

Pro Gly Ala Pro Gln Glu Pro Pro Gln Gln Pro Pro Gln Gln Pro Pro
 225 230 235 240

Gln Gln Pro Pro Gln Gln Pro Pro Gln Gln Pro Pro Gln Gln Pro Pro
 245 250 255

Gln Gln Pro Arg Pro Gln Pro Asp Gly Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn
 260 265 270

Asn Gly Asn Asn Asn Glu Asp Ser Tyr Val Pro Ser Ala Glu Gln Ile
 275 280 285

Leu Glu Phe Val Lys Gln Ile Ser Ser Gln Leu Thr Glu Glu Trp Ser
 290 295 300

Gln Cys Ser Val Thr Cys Gly Ser Gly Val Arg Val Arg Lys Arg Lys
 305 310 315 320

Asn Val Asn Lys Gln Pro Glu Asn Leu Thr Leu Glu Asp Ile Asp Thr
 325 330 335

Glu Ile Cys Lys Met Asp Lys Cys Ser Ser Ile Phe Asn Ile Val Ser
 340 345 350

Asn Ser Leu Gly
 355

<210> 10
 <211> 4
 5 <212> PRT
 <213> *Plasmodium falciparum*

<400> 10
 Asn Ala Asn Pro
 1

<210> 11
 <211> 4
 <212> PRT
 15 <213> *Plasmodium falciparum*

<400> 11
 Asn Val Asp Pro
 1

<210> 12
 <211> 11
 20 <212> PRT
 <213> *Plasmodium falciparum*

<400> 12
 Glu Asn Ala Asn Ala Asn Asn Ala Val Lys Asn
 1 5 10

<210> 13
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido Forw.Falc

<400> 13
ccaagcttgc caccatga tg agg 23

5 <210> 14
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido Rev.Falc.CS -2 8

<400> 14
ccggatcctc agcagatctt ctctcgc 27

15 <210> 15
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido Rev.Falc.CS -1 4

<400> 15
25 ccggatcctc agctgttcac cacgttg 27

<210> 16
<211> 22
<212> ADN
30 <213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido SV40for

35 <400> 16
caatgtatct tatcatgtct ag 22

<210> 17
<211> 35
40 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido pIXRmfe

45 <400> 17
ctctctcaat tgcagataca aaactacata agacc 35

<210> 18
<211> 32
50 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
55 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido pIX35mfe

<400> 18
ctctctcaat tgtctgtctt gcagctgtca tg 32

60 <210> 19
<211> 18
<212> PRT

<213> *Plasmodium yoelii*

<400> 19

Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly
1 5 10 15

Ala Pro

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Adenovirus recombinante de replicación defectuosa de un serotipo seleccionado del grupo que consiste en: Ad26 y Ad35, comprendiendo dicho adenovirus recombinante un ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6.
- 10 2. Adenovirus recombinante de replicación defectuosa según la reivindicación 1, en el que dicho ácido nucleico tiene codones optimizados para la expresión elevada en un ser humano, y comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:4.
- 15 3. Adenovirus recombinante de replicación defectuosa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, comprendiendo además dicho adenovirus un gen que codifica para un antígeno específico de hígado para *Plasmodium falciparum* como determinante antigénico, o una parte inmunogénica del mismo.
- 20 4. Adenovirus recombinante de replicación defectuosa según la reivindicación 3, en el que dicho antígeno específico de hígado es LSA-1.
5. Composición de vacuna que comprende un adenovirus recombinante de replicación defectuosa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. Composición de vacuna según la reivindicación 5, que comprende además un adyuvante.

Fig. 1A

M M R K L A I L S V S S F L F V E A L F Q Y E C Y
G S S N T R V L N E Y S L N Y D N A G T N L E N E L E
M N Y N G K D N E R L W E Y S L K K D K N S R D S L G E N D N D G
N N K P G H K V N K R L E N W E Y S L K D G N K R D G N E E N D N E K
L R K A N P A N P A N P A N P A N P A N P A N P A N P A N P A N P A N
P N A N P A N P A N P A N P A N P A N P A N P A N P A N P A N P A N
A N P A N P A N P A N P A N P A N P A N P A N P A N P A N P A N
P A N P A N P A N P A N P A N P A N P A N P A N P A N P A N P A N
A N K N A V T K E D E L S L A I G L I M V L S F I Q V R I K K S
N A N S L K P V N S A I G L I M V L S F I Q V R I K K S
Q N S L K P V N S A I G L I M V L S F I Q V R I K K S
S A N K P V N S A I G L I M V L S F I Q V R I K K S
S V F N V N S A I G L I M V L S F I Q V R I K K S *

Fig. 1B

AAGCTTGCCACCATGATGAGGAAACTGGCCATCCTGAGCGTGAGCAGCTTCCTGTTC
 GTGGAGCCCTGTTTCAGGAGTACCAGTGTCTACGGCAGCAGCAGCAACACCCGGGTG
 CTGAACGAGCTGAACACTACGACAACCGCCGGCACCAACCTGTACAACGAGCTGGAGATG
 AACTACTACGGCAAGCAGGAACTGGTACAGCTGAAGAAGAACAGCCGGTCTCTG
 GCGGAAACGACGACGGCAACAACAACGCGGACAACGGCCGGGAGGCAAGGAC
 GAGGACAAGCGGGACGGCAACAACGAGGACAACGAGAAGCTGCCGGAAGCCCAAGCAC
 AAGAACTTAAGCAGCCCGCGACGGCAACCCCGACCCCAACGCCCAACCCCAACGTG
 GACCCCAACGCCAATCCTAATGTCTGACCCCAATGCCAATCCGAACGTTGATCCCAAT
 GCGAATCCTAACGCTAACCCCAATGCCAACCCAAATGCCAATCCAAATGCAAATCCC
 AACGCCAATCCAAACGCAACCCTAATGTCTAATCCAAACGCTAATCCTAATGCCAAT
 CCCAATGCTAACCCCAACGTCGATCCTAACGCAAAATCCGAAACGCTAACCCCAACGCA
 AATCCCAACGCTAACCCGAAACGCAACCCCTAACGCCAATCCGAAATGCCAACCCCAAC
 GCCAACCCGAAACGCTAATCCGAAATGCTAACCCGAAATGCTAATCCTAACGCAACCCCA
 AATGCAAAACCCCAATGCAAAACCCGAAACGCCAATCCCAACGCCAATCCTAATGCCAAC
 AAGAACAATCAGGGCAACGGCCAGGGCCACAACATGCCCAACGCCCAACCCGGAAC
 GTGGACGGAACGCCAACGCCAACACCGCCGTGAAGAACAACAACGAGGAGCCC
 AGCGACAAGCACATCGAGCAGTACCTGAAGAAGATCCAGAACAGCCTGAGCACCGAG
 TGGAGCCCTGCAGCGTGACCTGCGGCAACGGCATTCAGGTGCCGATCAAGCCCGGC
 AGCGCCAACAAGCCCAAGGACGAGCTGGACTACGAGAAATGACATCGAGAAGAAGATC
 TGCAAGATGGAGAAATGACAGCAGCGTGTTCACCGTGGTGAACAGCGCCATCGGCCCTG
 ATATGGTCTGAGCTTCCTGTCTGAACTGAAGATCTGCTGATAAGGATCC

Fig. 2A

M M R K L A I L S V S S F L F V E A L F Q E Y Q
 C Y G S S N T R V V L N E L N Y D N A N G T N L Y
 N E L E M N Y G K N G R S L K K D E S R S L
 G E N D D G N E N G R E G K D E D K R D
 G N E D N E K L R K P N A N Q P A D G N
 P D P N A N P N V D N A N P N A N P N
 V D P N A N P N A N A N P N A N P N
 A N P N A N P N A N A N P N A N P N
 V D P N A N P N A N A N P N A N P N
 A N P N A N P N A N A N P N A N P N
 A N P N A N P N A N A N P N A N P N
 N Q G N G Q N N H N M E P E P S V T C G N I K
 N S A V K N N N N N N N N N N N N N N A
 Q N S L S T E N W S P C S V T C G N I K
 P G S A N K P F N V A N D S V T C G N I K
 E K C S S V F N V A N D S V T C G N I K

Fig. 2B

AAGCTTGCCACCATGATGAGGAAACTGGCCATCCTGAGCGTGAGCAGCTTCCTGT
 TCGTGAGGCCCTGTTTCAGGAGTACCAGTGCTACGGCAGCAGCAGCAACACCCCG
 GGTGCTGAACGAGCTGAACTACGACAACGCCGGCACCAACCTGTACAACGAGCTG
 GAGATGAACTACTACGGCAAGCAGGAGAACTGGTACAGCCTGAAGAAGAACAGCC
 GGTCTCTGGCGAGAACGACGGCAACAACAACCGGCGACAACGGCCCGGGA
 GGGCAAGGACGAGGACAAAGCGGGACGGCAACAACGAGGACAACGAGAAGCTGCGG
 AAGCCCCAAGCACAAGAAACTTAAGCAGCCCGCCGACGGCAACCCCGACCCCAACG
 CCAACCCCAACGTGGACCCCAACGCCAATCCTAATGTGACCCCAATGCCAATCC
 GAACGTTGATCCCAATGCGAATCCTAACGCTAACCCCAATGCCAACCCTAAATGCC
 AATCCCAAATGCCAAATCCCAACGCCAATCCAAACGCAAAACCCTAATGCTAATCCAA
 ACGCTAATCCTAATGCCAATCCCAATGCTAACCCAAACGTCGATCCTAACGCAAA
 TCCGAAACGCTAACCCCAACGCAAAATCCCAACGCTAACCCGAAACGCAAAACCCTAAC
 GCCAATCCGAATGCCAACCCTAAACGCCAACCCTAAACGCTAATCCGAAATGCTAACCC
 CGAATGCTAATCCTAACGCAAAACCCTAAATGCAAAACCCTAAATGCAAAACCCTGAAACGC
 CAATCCCAACGCCAATCCTAATGCCAAACAAGAACAATCAGGGCAACGGCCAGGGC
 CACAACATGCCCAACGCCAACCCTAAACGGAAACGTGGACGAGAACGCCAACGCCAACA
 GCGCCGTGAAGAACAACAACGAGGAGCCCAAGCCAGCCAGCAAGCACATCAAGGAGTA
 CCTGAACAAGATCCAGAACAGCCTGAGCACCGAGTGGAGCCCTGCAGCGTGACC
 TGCGGCAACGGCATTCAGGTGCGGATCAAGCCCGGCGAGCCCAACAAGCCCAAGG
 ACGAGCTGGACTACGCCAATGACATCGAGAAGAAGATCTGCCAAGATGGAGAAGTG
 CAGCAGCGTGTTC AACGTGGTGAACCTCCTGATAAAGATCTGCTGATAAGGATCC

Fig. 3A

M K K C T I L V V A S L L L V D S L L P G Y G
 Q N K S V Q A Q R N G K I N E L L C Y N E N D N K
 L Y H V L N G K K I D Y N R N E N R L L G
 D A L N G K K D E P K D P K D D L
 P K E P K K P K E L N Q G P P K D P K
 K D D P G A P Q G P G A P Q G P G A
 Q G P G P Q Q P Q P Q P Q P Q P Q P Q
 P Q G P G P Q Q P G A P G A P G A P G
 A P Q Q P P Q P P Q P P Q P P Q P P Q
 G A P Q Q P P Q P P Q P P Q P P Q P P Q
 P P Q Q P P Q P P Q P P Q P P Q P P Q
 Q P P Q Q P P Q P P Q P P Q P P Q P P Q
 N E D S Y S Q C S V T C G I L S G V R V C K M D K C S
 T E E W S Q C S V T C G I L S G V R V C K M D K C S
 N K Q P E N L T L E D I D T E I C K M D K C S
 S I F N I V S N S L G *

Fig. 3B

AAGCTTGTAGCCACCATGAAGAAGTGCACCATCCTGTGGTGGCCAGCCCTG
 CTGCTGGTGGACAGCCCTGTGCTGCCCGGTACGGCCAGAACAAGAGCGTGCAGG
 CCCAGCGAACCTGAACGAGCTGTGCTACAACGAGGAGAACGACAACAAGCT
 GTACCACTGTGTAACAGCAAGAACGGCAAGATTACAAACCGGAACATCGTG
 AACCGGCTGTGGCGACGCCCTGAACGGCAAGCCCGAGGAGAGAAGGACG
 ACCCCCCAAGGACGGCAACAAGGACGACCTGCCCAAGGAGGAGAAGAAAGA
 CGATCTGCCCTAAGGAGGAAAAAAGGACGATCCTCCTAAGGACCCCAAGAAG
 GACGATCCTCCCAAAGAGGCCCAAGAACAGTGAACCAAGCCCGTGGTGGCCG
 ACGAGAAGTGGACCCAGGCCCTGGCGCCCTCAGGGCCCCGGGGCCCCCTCA
 GGGCCCTGGAGCCCCCTCAAGGACCCGGAGCCCCCAGGGACCTGGCGCTCCT
 CAGGGACCCGGCGCTCCACAGGGCCCAAGGGCCCCCAGGGCCCCAGGGGCAC
 CCCAGGGCCCCAGGGCCCCACAAGGTCCCGGGCTCCTCAGGGTCCCGGAGC
 ACCTCAGGGCCCTGGAGCACACAGGGCCCTGGGGCCCCACAAGGGCCAGGC
 GCTCCCCAAGGGCTGGCGCACCCCAAGGAGCCCCCAGCAGCCCCCTCAGC
 AGCCCCCAGCAACTCCCCAACAGCTCCCCAGCAACCACACAGCAGCC
 ACCACAGCAACCCAGGCCCCAGCCCGACGGCAACAACAACAATAACAAC
 AACGGCAACAACAACGAGGACAGTACGTGCCCAAGCCGCGGAGCAGATCCTGG
 AGTTCGTGAAGCAGATCAGCAGCCAACTGACCCGAGGAGTGGAGCCAGTGCAG
 CGTGACCTGCGGCAGCGGGTGCGGGTGCGGAACCGGAAGAACGTGAACAAG
 CAGCCCGAAGAACCTGACCCCTGGAGGACATCGACACCCGAGATCTGCAAGATGG
 ACAAGTGCAGCAGCATCTCAACATCGTGAGCAACAGCCTGGGCTGAAGATC
 TGCTGATAAGTTTAAACGGATCC

Fig. 4A

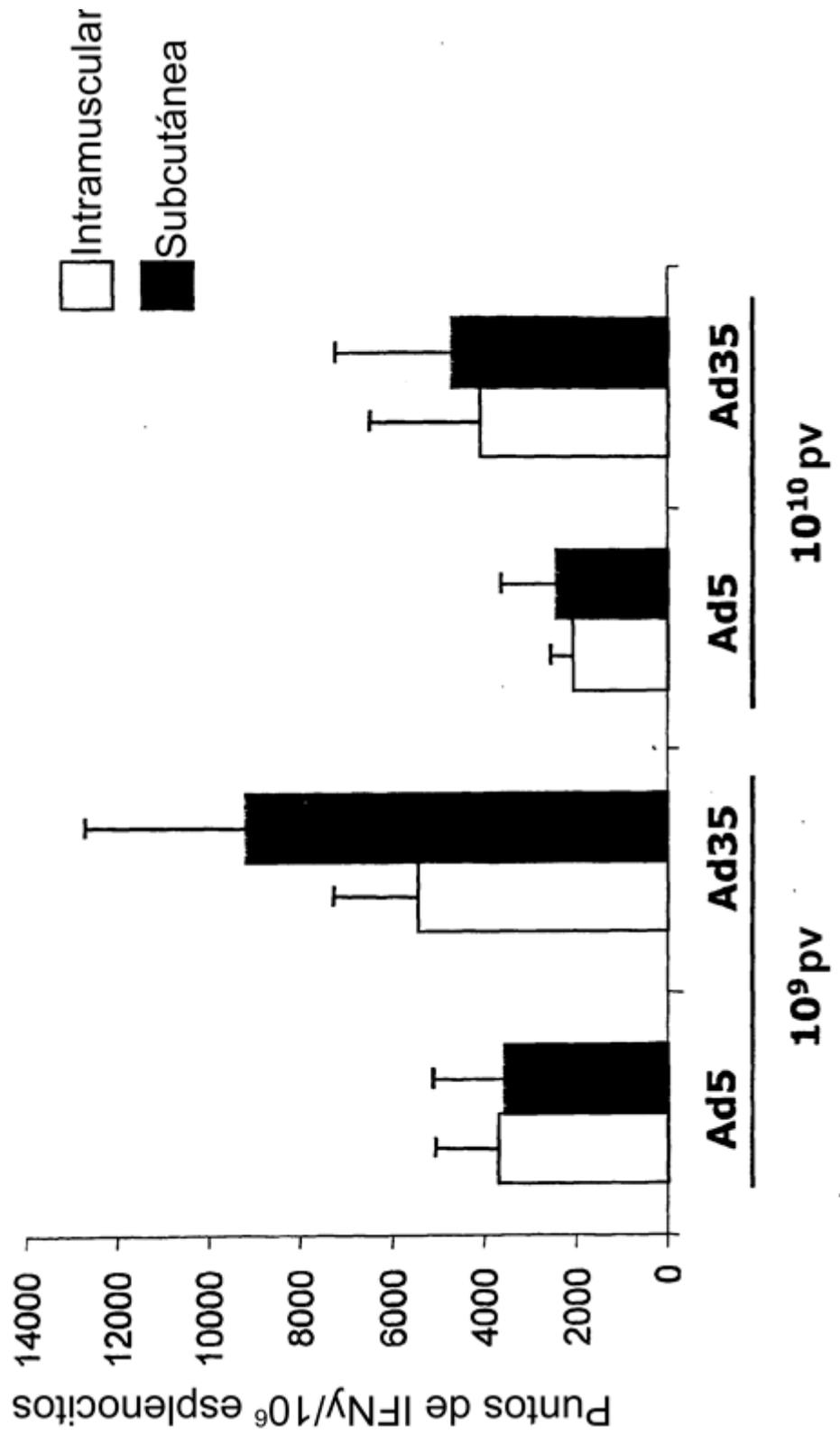


Fig. 4B

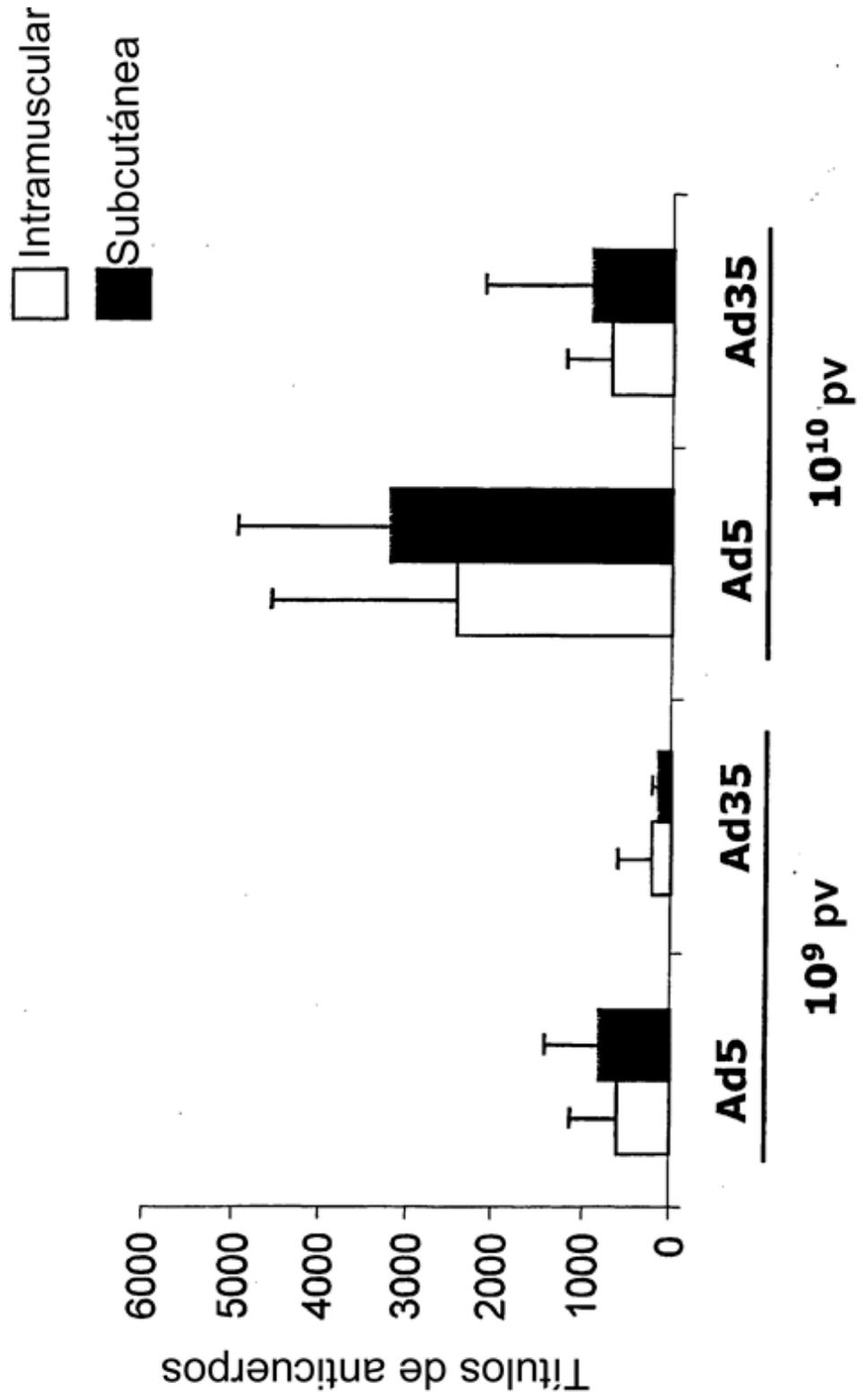


Fig. 5A

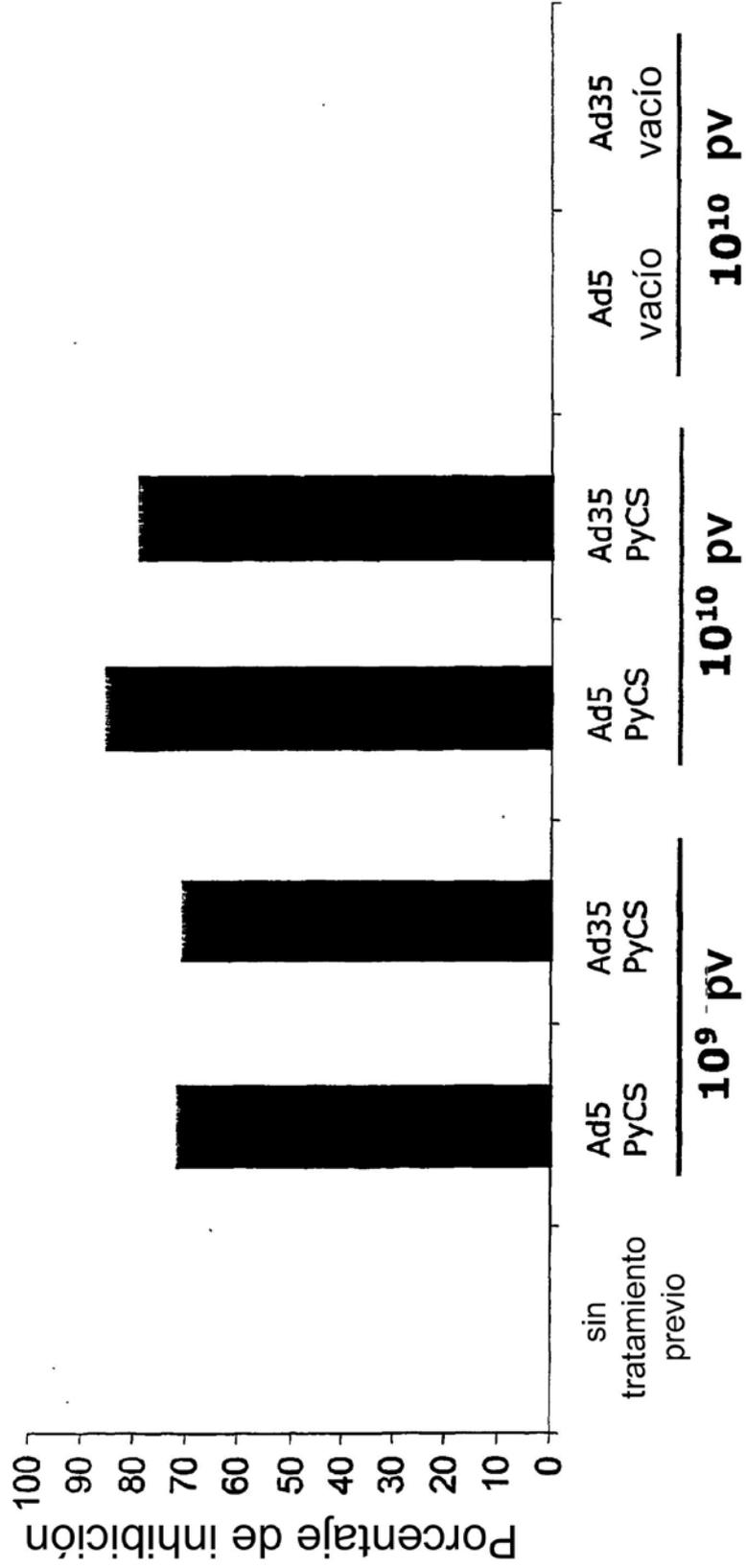


Fig. 5B

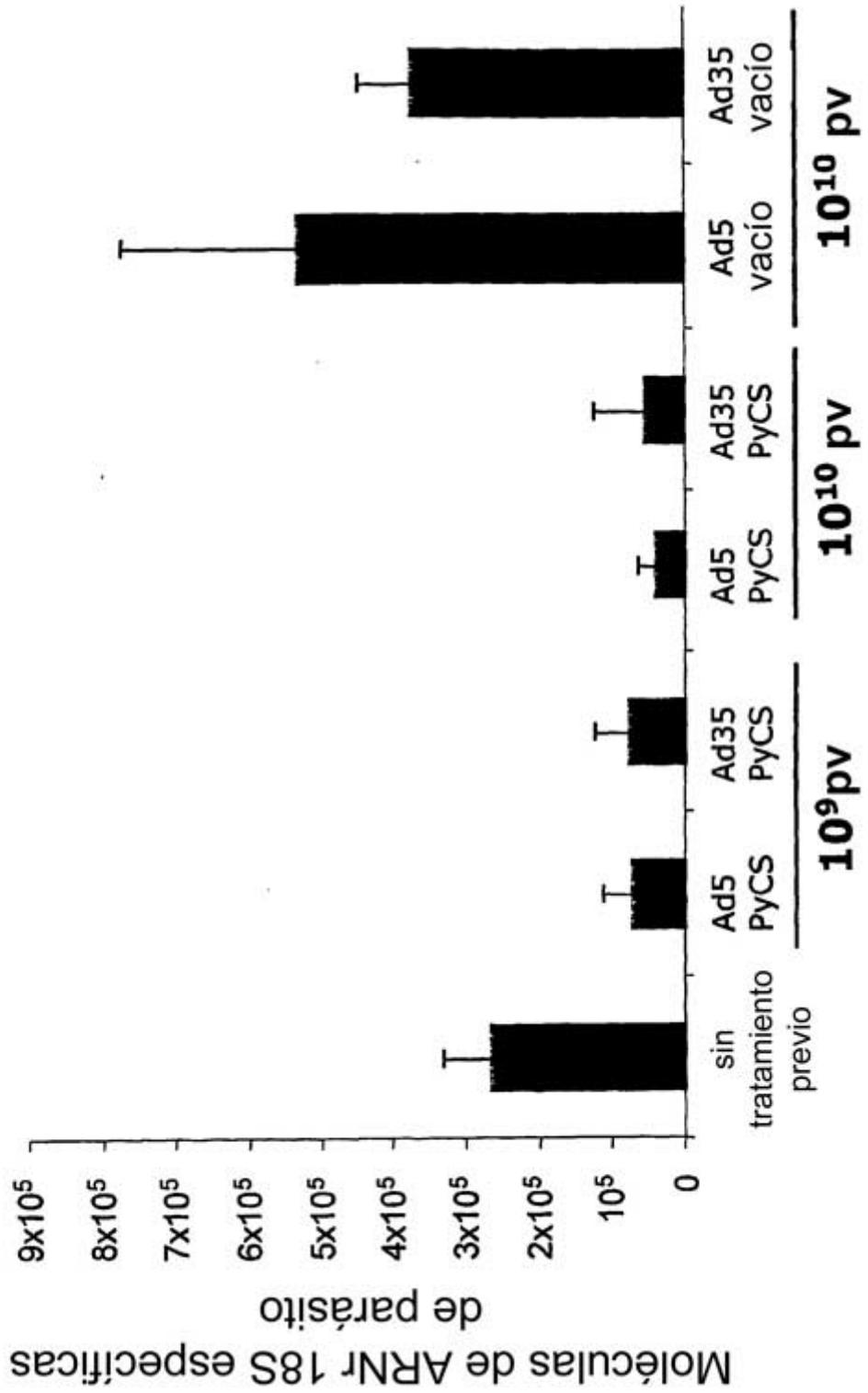


Fig. 6

