

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 082**

51 Int. Cl.:

A61K 39/015 (2006.01)

A61K 39/29 (2006.01)

C07K 14/445 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2007 E 07787569 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013 EP 2040743**

54 Título: **Vacunas contra la malaria**

30 Prioridad:

18.07.2006 GB 0614254

20.07.2006 GB 0614473

20.07.2006 GB 0614476

28.07.2006 GB 0615115

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

08.01.2014

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (50.0%)
rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE y
THE UNITED STATES OF AMERICA AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE
ARMY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**COHEN, JOSEPH DGLAXOSMITHKLINE
BIOLOGICALS S.A.;
MARCHAND, MARTINEGLAXOSMITHKLINE
BIOLOGICALS S.A.;
OCKENHOUSE, CHRISTIAN FWALTER REED
ARMY INSTITUTE OF RESEARCH y
YADAVA, ANJALIWALTER REED ARMY
INSTITUTE OF RESEARCH**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 437 082 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

5 La presente invención se refiere a una proteína novedosa híbrida/de fusión, procedimientos para preparar y purificar la misma, su uso en medicina, particularmente en la prevención de infecciones de malaria, por ejemplo las provocadas por *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), las composiciones/vacunas que contienen la proteína y el uso de las mismas, particularmente en terapia. La invención también se extiende a partículas lipoproteica de dicha proteína híbrida/de fusión y a formulaciones/vacunas que comprenden la misma y su uso.

10 La malaria es uno de los principales problemas de salud en el mundo con más de 2 a 4 millones de personas muriendo de la enfermedad cada año. Una de las formas más corrientes de la enfermedad está provocada por el parásito protozoo *P. vivax*, que se encuentra en las regiones tropicales y sub-tropicales. De manera interesante el parásito puede completar su ciclo en el mosquito a temperaturas tan bajas como 15 grados Celsius, lo que ha permitido que la enfermedad se extienda en climas templados.

15 El ciclo de vida de *P. vivax* es complejo, requiriendo dos huéspedes, hombre y mosquito para la finalización. La infección del hombre se inicia mediante la introducción de esporozoitos en la saliva de un mosquito infectado. Los esporozoitos migran al hígado y allí infectan los hepatocitos donde se diferencian, mediante la fase intracelular fuera de los eritrocitos, en la fase merozoito que infecta los glóbulos rojos (RBC) para iniciar la replicación cíclica en la fase de sangre asexual. El ciclo se completa mediante la diferenciación de un número de merozoitos en los RBC en los gametocitos de fase sexual que se ingieren por el mosquito, donde se desarrollan mediante una serie de fases en el intestino medio para producir esporozoitos que migran a la glándula salivar.

20 Debido al hecho de que la enfermedad provocada por *P. vivax* es raramente letal, se han centrado esfuerzos para evitar y tratar malaria en la forma más mortal de la enfermedad provocada por *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*).

25 Aunque la enfermedad provocada por *P. vivax* usualmente no da como resultado la muerte del paciente, debido al volumen de casos, que parece que se incrementa, el impacto significativo sobre la calidad de la vida del paciente, las reseñas crecientes de las graves incidencias de la enfermedad que dan como resultado anemia y muerte y el impacto económico, se requiere todavía una vacunación eficaz para la enfermedad.

30 Una característica de *P. vivax* es que algunas cepas son capaces de provocar infección retrasada permaneciendo latentes en el hígado antes de emerger en la circulación periférica para manifestar síntomas clínicos. De este modo los individuos, por ejemplo cuando viajan a través de un área infectada, se pueden infectar y aún no mostrar los síntomas durante varios meses. Esto tiene el potencial para provocar la extensión de la enfermedad y por esta razón a las personas que viajan a áreas infectadas no se les permite donar sangre para transfusión durante un período definido de tiempo después de viajar a la región infectada.

35 La infección de malaria por *P. vivax* permanece latente dentro del hígado mientras que el parásito experimenta esquizogonia pre-eritrocítica. Si el parásito está controlado en esta fase antes de que se escape del hígado no se observan síntomas clínicos de la enfermedad en el paciente.

40 La fase esporozoito de *P. vivax* se ha identificado como una diana potencial de una vacuna de malaria. Se ha mostrado que la vacunación con esporozoito desactivado (irradiado) induce protección contra la malaria humana experimental (Am. J. Trop. Med. Hyg. 24: 297-402, 1975). Sin embargo, no ha sido posible práctica y logísticamente fabricar una vacuna para malaria para la población general basada en esta metodología, empleando esporozoitos irradiados.

La proteína de superficie principal del esporozoito se conoce como proteína de circumsporozoitos (proteína CS). Se cree que está implicada en la movilidad e invasión del esporozoito durante su paso desde el sitio inicial de inoculación por el mosquito en la circulación, donde migra al hígado.

45 La proteína CS de las especies de Plasmodio se caracteriza por un dominio repetitivo central (región de repetición) flanqueado por fragmentos amino (extremo N-terminal) y carboxi (extremo C-terminal) no repetitivos. El dominio central de *P. vivax* está compuesto por varios bloques de una unidad de repetición, en general de nueve aminoácidos en tándem.

50 En ciertas cepas asiáticas, después de la región de repetición central, está presente una secuencia adicional de aproximadamente 12 aminoácidos (véase la SEC ID N.º 11). La función de esta última es desconocida. Sin embargo, se propone la hipótesis por algunos de que dichos aminoácidos pueden estar asociados a la aparición retrasada de los síntomas clínicos de la enfermedad, aunque esto no se ha investigado. Se cree que el extremo N-terminal se caracteriza por una secuencia de 5 aminoácidos conocida como región I (véase la SEC ID N.º 1). También se cree que el extremo C-terminal se caracteriza por comprender una secuencia de 18 aminoácidos conocida como región II. Esta última contiene un motivo adhesivo a célula, que está altamente conservado entre todas las proteínas CS de malaria (véase la SEC ID N.º 2).

5 Varios grupos han propuesto vacunas de subunidades basadas en la proteína de circumsporozoito. Dos de estas vacunas han experimentado ensayo clínico; una es un péptido sintético, la otra es una proteína recombinante (Ballou y col., Lancet: i 1277 (1987) y Herrington y col., Nature 328: 257 (1987)). Estas vacunas eran exitosas en la estimulación de una respuesta anti-esporozoita. Sin embargo, la magnitud de la respuesta era decepcionante, no teniendo algunas vacunas ninguna respuesta en absoluto. Además, la ausencia de "reinmunización" de niveles de anticuerpo en inyecciones posteriores y los resultados de los ensayos de proliferación de linfocitos *in vitro* sugieren que las células T de la mayoría de estos voluntarios no reconocieron la repetición inmunodominante. Sin embargo, uno de los voluntarios vacunados en cada estudio no desarrolló parasitemia.

10 Los documentos WO 93/10152 y WO 98/05355 describen una vacuna derivada de la proteína de CS de *P. falciparum* y parece que ha habido algún progreso hacia la vacunación contra *P. falciparum* usando el planteamiento descrito en esta memoria descriptiva, véase también Heppner y col., 2005, Vaccine 23, 2243-50.

15 La proteína CS en *P. falciparum* tiene una región de repetición central que está conservada. Por el contrario se conocen al menos dos formas (designadas VK210 o tipo I y VK247 o tipo II) de la proteína CS para *P. vivax*. Esto hace más difícil identificar una construcción de la proteína de CS con todas las propiedades deseadas tales como inmunogenicidad, que proporciona protección general contra *P. vivax* independientemente del tipo específico de proteína CS debido a que los anticuerpos dirigidos a la región de repetición central de tipo I no reconocen necesariamente los epítopes en la región correspondiente de tipo II y viceversa.

20 Una proteína CS de *P. vivax* recombinante se expresó y se ensayó como una vacuna en los años 1980-1990 con un éxito limitado (Collins y col., 1989. Am. J. Trop. Med. Hyg. 40, 455-64). Se ha hecho algún trabajo para desarrollar una vacuna basada en Péptidos Antigénicos Múltiples (MAP) que emplean uno o más epítopes que están entrecruzados (Nardelli y Tam, 1995, Pharm. Biotechnol. 6, 803-19). Los antígenos peptídicos de proteína CS de *P. vivax* que contienen las secuencias de región de repetición bien de la variante de tipo I o bien de la variante de tipo II conjugada con la región conservada (región II) que contiene la región de unión a hepatocitos prolongada para incluir un epítopo de células T, se han usado para inmunizar ratones (Thomas B.E. y cols., Annals of Tropical Medicine and Parasitology 2001, 95 (6): 573-586). Se vio una respuesta de proliferación de células T en células del bazo aisladas a partir de ratones inmunizados con estos conjugados.

30 La presente invención proporciona un nuevo antígeno, mejorado para uso en vacunas de malaria, que se cree que produce una respuesta humoral y también una respuesta inmune celular. El antígeno/partícula se cree que induce la producción de anticuerpos contra la proteína CS de tipo I y de tipo II. El antígeno/partícula también puede inducir células auxiliares T por ejemplo células Th1 y/o Th2.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona una proteína de fusión híbrida inmunógena que comprende:

- a. al menos una unidad de repetición derivada de la sección de repetición central de una proteína de circumsporozoito de tipo I de *P. vivax*,
- 35 b. al menos una unidad de repetición derivada de la sección de repetición central de una proteína de circumsporozoito de tipo II de *P. vivax*. y
- c. antígeno S de superficie derivado del virus de Hepatitis B.

Listado de secuencias

- SEC ID N.º 1 Región I en el extremo N-terminal (descrito anteriormente).
- 40 SEC ID N.º 2 Motivo de la región II en el extremo C-terminal (descrito anteriormente).
- SEC ID N.ºs 3-9 Diversos monómeros de la proteína CS de tipo I.
- SEC ID N.º 10 Monómero principal de la proteína CS de tipo II.
- SEC ID N.º 11 Aminoácidos adicionales encontrados en las cepas asiáticas.
- SEC ID N.º 12 Secuencia de nucleótidos para la proteína híbrida
- 45 (optimizada para la expresión en *E. coli*).
- SEC ID N.º 13 Secuencia de aminoácidos para la proteína híbrida CSV.
- SEC ID N.º 14 Monómero secundario de la proteína CS de tipo II.
- SEC ID N.º 15 Secuencia de nucleótidos para la proteína híbrida CSV (optimizada para la expresión en levadura).

- SEC ID N.º 16 Secuencia de nucleótidos para la proteína de fusión híbrida CSV-S.
- SEC ID N.º 17 Secuencia de aminoácidos para la proteína de fusión híbrida CSV-S.
- SEC ID N.º 18 Secuencia de nucleótidos para un módulo de expresión RTS y una proteína predicha RTS, S.
- SEC ID N.º 19 Secuencia de nucleótidos para el gen de fusión híbrido CSV-S (clonado en el vector de expresión de *Pichia pastoris* integrador pHIL-D2).
- SEC ID N.º 20 Secuencia de aminoácidos para la proteína de fusión híbrida CSV-S expresada en *Pichia pastoris*.
- SEC ID N.º 21 Mostrada en la Figura 12 es una comparación de la secuencia de una proteína recombinante de longitud completa CSV-S y una proteína truncada (CSVtr-S).

Figuras

- 10 Figura 1 Muestra una microfotografía electrónica de partículas de lipoproteína multimérica de la proteína híbrida de la invención producida en una cepa de levadura de *S. cerevisiae* (con un promotor constitutivo).
- Figura 2 es una transferencia de Western de una proteína híbrida de la invención y proteínas de comparación (parte de gel).
- 15 Figura 2a. es una transferencia de Western de una proteína híbrida de la invención y proteínas de comparación (gel completo de la Figura 2, en la que las bandas 1, 2 y 3 en la Figura 2 son las bandas 1, 2 y 8 en la Figura 2a).
- Figura 3 Mapa de plásmido para el vector recombinante pRIT15546 empleado para introducir la secuencia codificadora para la proteína de fusión CSV-S en la célula huésped de levadura (vector episomal).
- 20 Figura 4 Mapa de plásmido de pGF1-s2 un plásmido preparado mediante GSK empleado en la formación de la proteína de fusión de un antígeno deseado con el antígeno S de Hepatitis B.
- Figura 5 Mapa de plásmido de pRIT 15607 empleado en la formación de la proteína de fusión de un antígeno deseado con el antígeno S de Hepatitis B. La digestión con NotI libera un fragmento de ADN lineal de 6,8 kb que lleva el módulo de expresión CSV-S más el marcador selectivo HIS4, que se usa para la inserción en el cromosoma de levadura.
- 25
- Figura 6 Muestra una transferencia de Western de la proteína recombinante expresada en Y1840.
- Figura 7 Muestra una microfotografía electrónica de partículas de lipoproteína multimérica de la proteína híbrida de la invención producida en *Pichia pastoris* (una levadura “no convencional”, una levadura metilotrófica, en las que la expresión recombinante está dirigida por un promotor inducible por metanol).
- 30
- Se purificaron partículas de CSV-S a partir de extractos solubles (basados en el procedimiento de purificación de RTS, S) y se sometieron a análisis de microscopía electrónica. Las partículas se visualizaron después de la tinción negativa con ácido fosfotúngstico. La escala es equivalente a 100 nm.
- 35
- Figura 8 Mapa del plásmido de pRIT15582.

La digestión con *XhoI* libera un fragmento de ADN lineal de 8,5 kb que lleva el módulo de expresión CSV-S más el marcador selectivo LEU2, que se usa para la inserción en el cromosoma de levadura.

Figura 9 mapa de restricción del fragmento *XhoI* lineal usado para integrar el módulo CSV-V.

5 Figura 10 Transferencia de Western de proteínas recombinantes expresadas en la cepa Y1835.

Panel A: transferencia de Western revelada con anticuerpo anti S. Muestras cargadas (100 µg de proteína total/pocillo):

1: Y1631 (cepa que produce RTS, S, como comparación)

2: Y1835

10 3: Y1835

4: Y1834.

Panel B: la transferencia de Western se reveló con anticuerpo anti CSV. Muestras cargadas (100 µg de proteína total/pocillo):

1: Y1631 (cepa que produce RTS, S, como comparación)

15 2: Y1295

3: Y1835

4: Y1834

5: nr (otra construcción CSVS)

6: nr (otra construcción-solamente antígeno S).

20 Figura 11 Microfotografía electrónica de partículas mixtas CSV-S, S producidas en la cepa Y1835

Las partículas CSV-S, S se purificaron a partir de extractos de células solubles (en base al procedimiento de purificación de RTS, S) y se sometieron a análisis de microscopía electrónica. Las partículas se visualizaron después de la tinción negativa con ácido fosfotúngstico. La escala es equivalente a 100 nm.

25 Figura 12 Muestra una comparación de la proteína CS recombinante de longitud completa y una versión truncada de la proteína CS (CSVtr-S).

Proteína híbrida se refiere en esta memoria descriptiva a proteína derivada del tipo I y tipo II de *P. vivax*.

Proteína de fusión híbrida se refiere en esta memoria descriptiva a proteína derivada del tipo I y tipo II de *P. vivax* fusionada a otra proteína o fragmento de la misma.

30 En un aspecto la proteína de fusión híbrida de la invención comprende una proteína híbrida derivada de las proteínas CS de *P. vivax* (CSV) y la proteína de superficie principal conocida como el antígeno S de Hepatitis B, tal como el antígeno S derivado de un serotipo adw.

35 El componente de antígeno derivado de CSV (es decir la proteína híbrida) de la invención está en general fusionada al extremo aminoterminal de la proteína S. Más específicamente el extremo C-terminal del fragmento CSV está fusionado al extremo N-terminal de dicho antígeno S.

Se cree que la presencia del antígeno de superficie de Hepatitis B refuerza la inmunogenicidad de la parte de la proteína CS de la proteína híbrida, ayuda a la estabilidad, y/o asiste a la fabricación reproducible de la proteína.

40 En general la proteína híbrida también contendrá un fragmento del extremo N-terminal de una proteína CS de *Plasmodium* tal como *P. vivax* (tipo I o II), por ejemplo un fragmento que comprende la región I tal como los aminoácidos mostrados en la SEC ID N.º 1.

Como alternativa la proteína híbrida puede contener un fragmento del extremo N-terminal de la proteína CS de *P. falciparum*.

En un aspecto la proteína híbrida puede comprender una o más unidades de repetición de la región central de *P. falciparum*. Por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más unidades de repetición.

Usualmente la proteína híbrida contendrá un fragmento del extremo C-terminal de una proteína CS de *Plasmodium* tal como *P. vivax* (tipo I o II), por ejemplo un fragmento que comprende la región II tal como se muestra en la SEC ID N.º 2.

5 Como alternativa la proteína híbrida puede contener un fragmento del extremo C terminal de la proteína CS de *P. falciparum*.

Aunque sin querer someterse a las limitaciones de ninguna teoría se cree que los fragmentos N y C terminales incluyen varios epítopes de células T y B.

10 En las proteínas recombinantes a menudo se introducen aminoácidos no naturales en el proceso de clonación y se observan en la proteína expresada final. Por ejemplo varios tales como 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos se pueden insertar al comienzo (N-terminal) de la proteína. Si se insertan 4 aminoácidos en el comienzo de la proteína pueden ser por ejemplo MMAP. Además de o como alternativa 1, 2, o 3 tales como 1 aminoácido se puede(n) insertar en el cuerpo/mitad de la proteína en por ejemplo aproximadamente los aminoácidos 259, 260, 261 o 262. La inserción de aminoácidos puede ser el aminoácido con el símbolo P. En un aspecto la proteína empleada no incluye cualesquiera aminoácidos insertados mediante el proceso de clonación en el cuerpo/mitad de la proteína.

15 La invención también se extiende a una así llamada versión "truncada" de la proteína híbrida, por ejemplo como se muestra en la Figura 12 y CSVtr-S marcada.

De este modo la invención proporciona proteína híbrida truncada en la que al menos la región rica en arginina encontrada en el N-terminal de la proteína CS (aproximadamente en el aminoácido 60) se elimina/suprime.

20 En un aspecto la invención proporciona una proteína híbrida truncada, en la que al menos los aminoácidos 1 a 55 (o 1 a 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 o 70) están suprimidos. Esta proteína híbrida truncada puede incluir hasta 4 aminoácidos insertados en el comienzo de la proteína tales como MMAP.

En un aspecto la invención se refiere a una proteína híbrida, que excluye los aminoácidos 5 a 64 (inclusive) de la proteína recombinante de longitud completa.

25 Esta/estas proteína(s) híbrida(s) truncada(s) se puede(n) emplear en otros aspectos de la invención descrita más adelante.

Cualquier cepa adecuada de *P. vivax* se puede emplear en la invención incluyendo: Latinoamérica/Sudamérica (es decir sal 1, Belem), Corea, China, Tailandia, Indonesia, India y Vietnam. La construcción en la SEC ID N.º 13 se basa en una cepa coreana (más específicamente una cepa Surcoreana).

30 *P. vivax* con las proteínas CS de tipo I es más frecuente que *P. vivax* con las proteína CS de tipo II. Por lo tanto, en un aspecto de la invención se incluyen más unidades de repetición de tipo I en el híbrido que unidades de repetición de tipo II.

Más específicamente la proteína híbrida puede incluir 1 a 15 unidades de repetición tales como 9 unidades de repetición de tipo I.

Los ejemplos de los monómeros adecuados de las proteínas CS de tipo I se proporcionan en las SEC ID N.ºs 3 a 9.

35 En una realización la invención proporciona una proteína híbrida que comprende una mezcla de unidades de repetición diferentes de tipo I, tal como una de cada una de las listadas en las SEC ID N.ºs 3 a 9.

Una o más unidades de repetición pueden estar duplicadas en el híbrido, por ejemplo dos monómeros de la SEC ID N.ºs 3 y/o de la SEC ID N.º 4 se pueden incorporar en la construcción.

a) En un aspecto la proteína CS comprende una unidad de SEC ID N.º 3.

40 b) En un aspecto la proteína CS comprende una unidad de SEC ID N.º 4, opcionalmente en combinación con una unidad como se describe en el párrafo a) inmediatamente anterior.

c) En un aspecto la proteína CS comprende una unidad de SEC ID N.º 5, opcionalmente en combinación con una unidad como se describe en el párrafo a) o en el b) inmediatamente anteriores.

45 d) En un aspecto la proteína CS comprende una unidad de SEC ID N.º 6, opcionalmente en combinación con una o más unidades como se describe en los párrafos a) a c) inmediatamente anteriores.

f) En un aspecto la proteína CS comprende una unidad de SEC ID N.º 7, opcionalmente en combinación con una o más unidades como se describe en los párrafos a) a d) inmediatamente anteriores.

g) En un aspecto la proteína CS comprende una unidad de SEC ID N.º 8, opcionalmente en combinación con una o

más unidades como se describe en los párrafos a) a f) inmediatamente anteriores.

h) En un aspecto la proteína CS comprende una unidad de SEC ID N.º 9, opcionalmente en combinación con una o más unidades como se describe en los párrafos a) a g) inmediatamente anteriores.

5 Los ejemplos de unidades de repetición componentes adecuadas de las proteínas CS de tipo II se proporcionan en las SEC ID N.ºs 10 y 14, tales como 10.

En un aspecto de la invención se proporciona una proteína híbrida con 5 o menos unidades de repetición derivadas del tipo II tal como un monómero, por ejemplo como se muestra en la SEC ID N.º 10.

La proteína híbrida también puede incluir la inserción de 12 aminoácidos encontrada al final de la región de repetición encontrada en ciertas cepas asiáticas de *P. vivax*, por ejemplo como se muestra en la SEC ID N.º 11.

10 En una realización la proteína híbrida comprende 257 aminoácidos derivados de la proteína CS de *P. Vivax*.

En una realización la proteína de fusión híbrida comprende 494 aminoácidos, por ejemplo 257 de los cuales se derivan de la proteína CS de *P. Vivax*.

En un aspecto la proteína CS comprende proteína de longitud completa.

15 En un aspecto la proteína CS empleada es una versión truncada, por ejemplo como se muestra en la Figura 12 o una truncada correspondiente en la que los aminoácidos aproximadamente 1 a aproximadamente 67 están suprimidos.

En una realización entre 1 y 5 aminoácidos adicionales están insertados al comienzo de la secuencia como resultado del procedimiento de clonación, por ejemplo MMAP o MMAPG insertados.

20 La proteína híbrida y/o proteína de fusión también puede incluir antígenos adicionales derivados de *P. falciparum* y/o *P. vivax*, por ejemplo en la que el antígeno se selecciona de DBP, PvTRAP, PvMSP2, PvMSP4, PvMSP5, PvMSP6, PvMSP7, PvMSP8, PvMSP9, PvAMA1 y RBP o un fragmento de los mismos.

25 En una realización la proteína de fusión híbrida (CSV-S) tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 17. En la secuencia, los aminoácidos 6 a 262 se derivan de CSV y 269 a 494 se derivan de S. Los aminoácidos que quedan se introducen mediante construcción genética (estos pueden, en particular, variarse si se desea).

Las propiedades de la proteína de fusión CSV-S de la SEC ID N.º 17 se proporcionan en las tablas más adelante:

Análisis	Proteína completa
Peso molecular	51794,75 p.m.
Longitud	494
1 microgramo =	19,307 pmoles
Coefficiente de extinción molar	90780 +/- 5 %
1 A (280) =	0,57 mg/ml
Punto isoeléctrico	7,33
Carga a pH 7	1,05

ES 2 437 082 T3

Análisis de la composición de la proteína completa

Aminoácido(s)	Recuento del número	% en peso	% en frecuencia
Cargados (RKHYCDE)	106	26,35	21,46
Ácidos (DE)	38	8,82	7,69
Básicos (KR)	39	10,68	7,89
Polares (NCQSTY)	134	28,15	27,13
Hidrófobos (AILFWV)	167	34,68	33,81
A Ala	52	7,14	10,53
C Cys	18	3,58	3,64
D Asp	24	5,33	4,86
E Glu	14	3,49	2,83
F Phe	17	4,83	3,44
G Gly	64	7,05	12,96
H His	4	1,06	0,81
I Ile	17	3,71	3,44
K Lys	20	4,95	4,05
L Leu	42	9,18	8,50
M Met	8	2,03	1,62
N Asn	32	7,05	6,48
P Pro	40	7,50	8,10
Q Gln	21	5,20	4,25
R Arg	19	5,73	3,85
S Ser	30	5,04	6,07
T Thr	26	5,08	5,26
V Val	26	4,78	5,06
W Trp	14	5,03	2,83
Y Tyr	7	2,21	1,42
B Asx	0	0,00	0,00
Z Glx	0	0,00	0,00
X Xxx	0	0,00	0,00
. Ter	1	0,00	0,20

Las propiedades de la proteína de fusión CSV-S de la SEC ID N.º 20 se proporcionan en las tablas más adelante:
Nishikawa y Ooi 1987

ES 2 437 082 T3

Análisis	Proteína completa
Peso molecular	51762,69 p.m.
longitud	494
1 microgramo =	19,319 pmoles
Coefficiente de extinción molar	90780 ± 5 %
1 A (280) =	0,57 mg/ml
Punto isoeléctrico	7,33
Carga a pH 7	1,05

Análisis de la composición de la proteína completa

Aminoácido(s)	Recuento del número	% en peso	% en frecuencia
Cargados (RKHYCDE)	106	26,37	21,46
Ácidos (DE)	38	8,83	7,69
Básicos (KR)	39	10,69	7,89
Polares (NCQSTY)	134	28,17	27,13
Hidrófobos (AILFWV)	168	34,89	34,01
A Ala	52	7,14	10,53
C Cys	18	3,59	3,64
D Asp	24	5,34	4,86
E Glu	14	3,49	2,83
F Phe	17	4,83	3,44
G Gly	64	7,05	12,96
H His	4	1,06	0,81
I Ile	17	3,72	3,44
K Lys	20	4,95	4,05
L Leu	42	9,18	8,50
M Met	7	1,77	1,42
N Asn	32	7,05	6,48
P Pro	40	7,50	8,10
Q Gln	21	5,20	4,25
R Arg	19	5,73	3,85
S Ser	30	5,05	6,07
T Thr	26	5,08	5,26

Aminoácido(s)	Recuento del número	% en peso	% en frecuencia
V Val	26	4,98	5,26
W Trp	14	5,04	2,83
Y Tyr	7	2,21	1,42
B Asx	0	0,00	0,00
Z Glx	0	0,00	0,00
X Xxx	0	0,00	0,00
. Ter	1	0,00	0,20

La proteína de fusión híbrida CSV-S puede por ejemplo prepararse empleando el plásmido pGF1-s2 (véase la Fig. 4 y los ejemplos para detalles adicionales), que cuando la secuencia apropiada que corresponde a CSV se inserta en el sitio de clonación SmaI procesa la inserción para validar la proteína de fusión CSV-S.

5 La secuencia de nucleótidos para la proteína de fusión híbrida de la SEC ID N.º 17 se proporciona en la SEC ID N.º 16. La parte CSV de esta secuencia era de codón optimizado para optimizar la expresión en levadura.

Como alternativa la proteína de fusión híbrida CSV-S puede, por ejemplo, prepararse como se describe en el ejemplo 2.

Una secuencia de nucleótidos alternativa para la proteína de fusión híbrida de la invención se proporciona en la SEC ID N.º 19 y la secuencia de aminoácidos para la misma se proporciona en la SEC ID N.º 20.

10 La presente invención también proporciona secuencias de nucleótidos, por ejemplo ADN, que codifican las proteínas de la presente invención.

Las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de la presente invención están, en una realización flanqueadas por elementos de control de la transcripción, preferiblemente derivados de genes de levaduras y se incorporan en un vector de expresión.

15 Un módulo de expresión para proteínas híbridas de la invención puede construirse, por ejemplo, comprendiendo las siguientes características.

- una secuencia promotora, derivada de, por ejemplo, el gen *TDH3* de *S. cerevisiae*.
- una secuencia que codifica la proteína de fusión híbrida CSV-S apropiada
- una secuencia de terminación de la transcripción contenida dentro de la secuencia, derivada de, por ejemplo, el gen *ARG3* de *S. cerevisiae*.

20

Un ejemplo de un promotor específico es el promotor del gen *TDH3* de *S. cerevisiae* Musti y col.

La invención también se extiende a vectores empleados en la preparación de la proteína de fusión híbrida.

25 Un plásmido adecuado se puede emplear después para introducir la secuencia que codifica la proteína de fusión híbrida en un huésped adecuado para síntesis. Un ejemplo de un plásmido adecuado es pRIT15546 un vector basado en 2 micrómetros para llevar el módulo de expresión de CSV-S, véase el mapa de plásmido del mismo en la Figura 3.

Como alternativa los plásmidos son conocidos por los expertos en la técnica y/o se describen en los ejemplos.

El plásmido en general contendrá un marcador empotrado para ayudar a la selección, por ejemplo un gen que codifica resistencia a antibióticos o auxotrofia para LEU y/o para HIS.

30 En un aspecto el plásmido es episomal es decir el gen para la proteína no está integrado en el ADN del huésped.

La invención también se refiere a una célula huésped transformada con un vector de acuerdo con la invención. Las células huéspedes pueden ser procariontes o eucariotes pero preferiblemente, son levaduras, por ejemplo levaduras *Saccharomyces* (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae* tal como DC5 en la base de datos de la ATCC (número de acceso 20820), con el nombre RIT DC5 cir(o)). Depositante: Smith Kline-RIT) y levaduras no *Saccharomyces*. Estas incluyen *Schizosaccharomyces* (por ejemplo *Schizosaccharomyces pombe*) *Kluyveromyces* (por ejemplo

35

Kluyveromyces lactis), *Pichia* (por ejemplo *Pichia pastoris*), *Hansenula* (por ejemplo *Hansenula polymorpha*), *Yarrowia* (por ejemplo *Yarrowia lipolytica*) y *Schwanniomyces* (por ejemplo *Schwanniomyces occidentalis*).

5 En un aspecto la invención se refiere a una cepa de levadura recombinante Y1834 (y al uso de la misma), que expresa una proteína de fusión híbrida CSV-S y/o partículas inmunógenas de la misma, véanse los ejemplos para la preparación de la misma.

En un aspecto la invención se refiere a una cepa de levadura recombinante Y1835 (y al uso de la misma), que expresa una proteína de fusión híbrida CSV-S y/o partículas inmunógenas de la misma, véanse los ejemplos para la preparación de la misma.

10 En un aspecto alternativo la invención se refiere a una cepa de levadura recombinante Y1840 (y uso de la misma), que expresa una proteína de fusión híbrida CSV-S y/o partículas inmunógenas de la misma.

Más específicamente la invención se refiere a dicha levadura (o a otra levadura) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión de la invención, uso de las levaduras para la preparación de dicha proteína de fusión y procedimientos que implican la preparación de dicha proteína de fusión.

15 La secuencia de nucleótidos (o una porción de la misma, tal como la porción que codifica la proteína híbrida pero opcionalmente no la porción que codifica la proteína S) puede estar codón-optimizada para la expresión en el huésped relevante tal como levadura.

20 Codón-optimizada en este contexto pretende significar que los codones están modificados para volverlos apropiados para la expresión en el huésped relevante. Esto puede ser o no la selección del codón más óptimo, por ejemplo se puede seleccionar una versión optimizada sub-óptima si la expresión de la misma es mayor que la de una versión óptima.

En las células de levaduras una vez expresada, la proteína de fusión híbrida (que comprende el antígeno S), es capaz de ensamblarse espontáneamente en una estructura/partícula lipoproteica compuesta de numerosos monómeros de dichas proteínas.

25 Estas partículas también se pueden denominar Partículas Similares a Virus (VLP). Las partículas también se pueden describir como partículas lipoproteicas multiméricas.

Estas partículas se pueden preparar en un número de formas, por ejemplo fusionando cada uno de los antígenos derivados de *Plasmodium* a otro compañero de fusión, (por ejemplo los antígenos del virus Hepatitis B o una proteína estructural vírica) y expresando esto en un huésped adecuado tal como levadura o bacterias.

30 Cuando la cepa de levadura receptora elegida también lleva en su genoma una o más copias integradas de un módulo de expresión de S de Hepatitis B, la cepa resultante sintetiza la proteína híbrida como una proteína de fusión y también antígeno S no fusionado. Estos se pueden ensamblar espontáneamente en partículas lipoproteicas que comprenden monómeros de la proteína de fusión híbrida y monómeros del antígeno S.

35 Aunque sin querer someterse a las limitaciones de ninguna teoría, las partículas, por ejemplo cuando se expresan en Y1834, se cree que constan esencialmente de unidades/monómeros de la proteína de fusión híbrida, aunque puede ser que la composición de partículas varíe de acuerdo con la levadura específica empleada.

De este modo en algunos casos las partículas lipoproteicas también pueden contener los monómeros del antígeno S sin fusionar, por ejemplo como en las partículas que son el resultado de la preparación en la levadura Y1835.

De este modo en un aspecto la invención proporciona una partícula inmunógena que comprende proteínas de fusión híbridas de la invención.

40 De este modo en un aspecto la partícula es una "así llamada" partícula simple porque consta esencialmente de unidades de la proteína de fusión híbrida. En un aspecto alternativo de la invención la partícula lipoproteica inmunógena comprende una o más proteínas de fusión híbridas y una o más unidades S de proteína no fusionada(s), en una partícula llamada doble o mixta.

45 Las Figuras 1 y 7 son microfotografías electrónicas de una partícula lipoproteica de acuerdo con este aspecto de la invención, aunque preparado en diferente levadura.

Las partículas mostradas en la microfotografía se purificaron mediante técnicas clásicas usando un gradiente de cloruro de cesio y sacarosa, en particular usando gradientes sucesivos de cloruro de cesio y sacarosa, más específicamente: 1 gradiente de sacarosa seguido de 3 gradientes sucesivos de CsCl.

50 La invención incluye procedimientos de purificación de dichas partículas, por ejemplo empleando un gradiente de cloruro de cesio y sacarosa.

- De manera adicional, se propone la hipótesis de que, los tensioactivos usados para liberar la proteína de las células puedan también ayudar a la estabilización de las partículas lipoproteicas. En un aspecto adicional la partícula lipoproteica comprende un tensioactivo. El tensioactivo se puede, por ejemplo, seleccionar entre Tween (tal como Tween 20), brij, polietilenglicol. La partícula puede, por ejemplo, comprender 1 % o menos, tal como 0,5 % o 0,1 % en peso de tensioactivo.
- Se propone la hipótesis de que las partículas lipoproteicas de la invención puedan contribuir a estimular adicionalmente la respuesta inmune a la proteína de fusión híbrida *in vivo*.
- La presente invención también se refiere a vacunas que comprenden una cantidad inmunoprotectora de una proteína o partícula de acuerdo con la invención en mezcla con un diluyente o vehículo adecuado.
- La invención también se extiende a una composición que comprende una proteína híbrida/de fusión o partícula de acuerdo con la invención y un vector vírico que comprende un antígeno de malaria, particularmente un antígeno de malaria común con dicha partícula y opcionalmente un adyuvante.
- En el contexto de esta memoria descriptiva, excipiente se refiere a un componente en una formulación farmacéutica sin efecto terapéutico en sí mismo. Un diluyente o vehículo cae dentro de la definición de un excipiente.
- En un aspecto la composición de la invención comprende una proteína de fusión híbrida y/o partícula como se describe en esta memoria descriptiva y un adyuvante.
- En una realización la construcción del vector vírico es como se describe en el documento WO 2004/055187.
- En una realización dichas proteínas de fusión están en mezcla y de esta manera están disponibles como una sola formulación. En una realización alternativa las proteínas de fusión se preparan como formulaciones separadas y se administran por separado al paciente.
- Se describe en esta memoria descriptiva un tratamiento combinado de *P. falciparum* y *P. vivax*, que comprende:
una proteína de fusión inmunógena que comprende un antígeno derivado de una proteína CS de *P. vivax* y
una proteína de fusión inmunógena que comprende un antígeno derivado de la proteína CS de *P. falciparum*.
- El antígeno derivado de la proteína CS del componente de *P. vivax* de la fusión puede ser una proteína CS de origen natural (nativa) tal como el tipo I y/o el tipo II o un fragmento de la misma. Como alternativa el antígeno puede ser una proteína híbrida (quimérica), como se ha descrito anteriormente, tal como la proteína identificada en las SEC ID N.ºs 13 y/o 15.
- Un componente antígeno de la proteína de fusión derivado de *P. falciparum* se puede preparar de acuerdo con el documento WO 93/10152 por ejemplo como RTS, S (en la que "S" representa un monómero sin fusionar) o como RTS, ambos son adecuados para usar en este aspecto de la invención.
- En una realización, el antígeno derivado de *P. falciparum* comprende al menos 4 unidades de repetición de la región de repetición central. Más específicamente este antígeno comprende una secuencia que contiene al menos 160 aminoácidos que es sustancialmente homóloga a la parte C-terminal de la proteína CS. La proteína CS puede estar desprovista de los últimos 12 a 14 aminoácidos del C-terminal.
- Más específicamente la proteína de fusión relevante que comprende una porción de la proteína CS de *P. falciparum* puede corresponder sustancialmente a los aminoácidos 207-395 de 7G8 de *P. falciparum* fusionados en fase mediante un engarce lineal al extremo N-terminal del antígeno S. El engarce puede comprender una parte de preS2 del antígeno S.
- Más específicamente la proteína de fusión derivada de *P. falciparum* empleada es la codificada por la secuencia de nucleótidos para el módulo de expresión RTS como se proporciona en la SEC ID N.º 18.
- Los antígenos S adecuados, pueden comprender un preS2. Un ejemplo de un serotipo adecuado es adw (Nature 280: 815-819, 1979).
- En un aspecto las proteínas de fusión híbridas de la invención comprenden una parte derivada de una proteína S mutante, por ejemplo, como se describe en la solicitud de los Estados Unidos publicada N.º 2006/194196 (también publicada como WO 2004/113369). Este documento describe un HDB05 marcado mutante. En particular describe comparaciones del mutante y la proteína de tipo salvaje en las Figuras 1 y 6 y los genes para el mutante en las Figuras 4 y 5. Las secuencias 12 a 22 allí describen polipéptidos particulares de la proteína S mutante. Cada una de las anteriores se incorpora en esta memoria descriptiva por referencia.
- Está descrito en la presente memoria descriptiva el uso de dicha combinación para el tratamiento, más particularmente el uso como una vacuna para la prevención de malaria y el procedimiento de tratamiento de un

paciente susceptible a infección por *Plasmodium* que comprende la administración de una cantidad eficaz de cada uno de los componentes bien de manera simultánea o bien de manera secuencial, para tratar o evitar de esta manera malaria.

También está descrita en la presente memoria descriptiva una combinación para el tratamiento que comprende:

- 5 un antígeno híbrido inmunógeno que comprende
- a. al menos una unidad de repetición derivada de la sección de repetición central de una proteína de circumsporozoito de tipo I de *P. vivax*,
 - b. al menos una unidad de repetición derivada de la sección de repetición central de una proteína de circumsporozoito de tipo II de *P. vivax* y

- 10 una proteína de fusión inmunógena que comprende un antígeno derivado de la proteína CS de *P. falciparum*.

Por ejemplo, cuando dicho antígeno híbrido y dicha proteína de fusión se administran de manera concomitante por ejemplo pueden estar en mezcla para la administración de manera simultánea o como alternativa se pueden formular para la administración de manera secuencial.

También está descrita en la presente memoria descriptiva una combinación para tratamiento que comprende:

- 15 un antígeno híbrido inmunógeno que comprende
- a. al menos una unidad de repetición derivada de la sección de repetición central de una proteína de circumsporozoito de tipo I de *P. vivax*,
 - b. al menos una unidad de repetición derivada de la sección de repetición central de una proteína de circumsporozoito de tipo II de *P. vivax* y

- 20 un vector vírico que codifica un antígeno de malaria, tal como dicho antígeno híbrido.

Por ejemplo, en el que dicho antígeno híbrido y dicho vector vírico se administran de manera concomitante, por ejemplo se pueden mezclar para la administración de manera simultánea o como alternativa se pueden formular para la administración de manera secuencial.

- 25 Como se usa en esta memoria descriptiva el término “de manera concomitante” significa en la que dicha combinación de componentes se administra dentro de un período de no más de 12 horas por ejemplo dentro de un período de no más de 1 hora, típicamente en una ocasión, por ejemplo en el curso de la misma visita al profesional de la salud, por ejemplo donde se administran de manera secuencial o simultánea.

También está descrita en la presente memoria descriptiva una composición de vacuna que comprende dichos elementos.

- 30 También está descrito un kit de vacuna que comprende dichos elementos para tratar malaria.

Se describen adicionalmente regímenes de recuerdo de inmunización que comprenden dichos elementos, por ejemplo inmunizando con antígeno y/o partículas de *P. falciparum* y reinmunizando con antígeno y/o con partículas de *P. vivax* y *viceversa*.

- 35 El régimen de recuerdo de inmunización puede, por ejemplo comprender componentes derivados únicamente o solamente de *P. vivax*.

En otra realización la inmunización se puede efectuar con ADN de plásmido/desnudo y la reinmunización es con antígeno de acuerdo con la invención y/o *viceversa*.

Como alternativa, la inmunización se puede efectuar con un vector vírico apropiado y la reinmunización con antígeno de acuerdo con la invención o *viceversa*.

- 40 Los regímenes de recuerdo de inmunización generales se describen más adelante.

Por ejemplo:

- la inmunización puede ser con un antígeno (tal como un antígeno acompañado de adyuvante) que comprende al menos una unidad de repetición de tipo I de la proteína CS de *P. vivax* y al menos una unidad de repetición de tipo II de la proteína CS de *P. vivax* y la reinmunización puede ser con un vector vírico que codifica el mismo/el correspondiente antígeno,
- 45

- la inmunización puede ser con antígeno (tal como un antígeno acompañado de adyuvante) que comprende al menos una unidad de repetición o epítoto de *P. vivax* y al menos una unidad de repetición o epítoto de la proteína CS de *P. falciparum* y la reinmunización puede ser con una proteína vírica que codifica el mismo/el correspondiente antígeno,

5 • la inmunización puede ser con vector vírico que codifica un antígeno que comprende al menos una unidad de repetición de tipo I de la proteína CS de *P. vivax* y al menos una unidad de repetición de tipo II de la proteína CS de *P. vivax* o que comprende al menos una unidad de repetición o epítoto de *P. vivax* y al menos una unidad de repetición o epítoto de la proteína CS de *P. falciparum* y la reinmunización con el mismo/el correspondiente antígeno acompañado de adyuvante en la forma de una proteína y/o partícula inmunógena.

10 Antígeno en estos contextos incluye proteína de fusión híbrida y/o partículas inmunógenas de la invención. En estos regímenes de recuerdo de inmunización el antígeno estará usualmente acompañado de adyuvante.

En este/estos aspecto(s) de la invención las preferencias descritas anteriormente para la proteína híbrida derivada de *P. vivax* también se aplican. De este modo en un aspecto la proteína híbrida tiene la secuencia en la SEC ID N.º 13.

15 RTS, S y el antígeno (en la forma de una partícula inmunógena) de *P. falciparum* se pueden preparar como se describe en el documento WO 93/10152.

En un aspecto la invención proporciona un vector vírico de replicación deficiente que codifica una proteína de fusión híbrida de acuerdo con la invención. Los vectores víricos adecuados se pueden derivar de vectores adenovíricos, vectores víricos adeno-asociados (AAV), sarampión, lentivirus, alfavirus, baculovirus, virus herpes simples y poxvirus tales como viruela bovina, viruela de pollo, viruela de paloma, viruela de canario, viruela de cerdos y viruela de ovejas/cabras. La metodología para preparar vectores adenovíricos que codifican un antígeno de malaria se describe, por ejemplo, en el documento WO 2004/055187.

20 La proteína codificada por el vector puede, por ejemplo, modificarse para evitar la glucosilación de la proteína durante la expresión, por ejemplo, ciertas serinas se pueden reemplazar por restos alanina para reducir la glucosilación.

Adenovirus

Los vectores adenovíricos de la presente invención comprenden uno o más polinucleótidos (ADN) heterólogos que codifican uno o más polipéptidos inmunógenos.

30 Los vectores adenovíricos de uso en la presente invención se pueden derivar de un intervalo de huéspedes mamíferos.

Los adenovirus (en esta memoria descriptiva denominados "Ad" o "Adv") tienen una morfología característica con una cápside icosaédrica que consta de tres proteínas principales hexón (II), base de pentón (III) y fibra nudosa (IV), junto con un número de otras proteínas secundarias VI, VIII, IX, IIIa y IVa2 (Russell W.C. 2000, Gen Virol, 81: 2573-2604). El genoma del virus es un ADN lineal de doble cadena con una proteína terminal unida de manera covalente a los extremos 5', que tienen repeticiones terminales invertidas (ITR). El ADN del virus está íntimamente asociado a la proteína altamente básica VII y a un péptido pequeño llamado mu. Otra proteína, V, está empaquetada con este complejo ADN-proteína y proporciona una unión estructural a la cápside mediante la proteína VI. El virus también contiene una proteasa codificada por el virus, que es necesaria para el procesamiento de alguna de las proteínas estructurales para producir el virus infeccioso maduro.

40 Se han aislado por encima de 100 serotipos distintos de adenovirus que infectan diversas especies de mamíferos, 51 de los cuales son de origen humano. De este modo uno o más de los vectores adenovíricos se pueden derivar de un adenovirus humano. Los ejemplos de tales adenovirus derivados de humanos son Ad1, Ad2, Ad4, Ad5, Ad6, Ad11, Ad24, Ad34, Ad35, Ad50/51 particularmente Ad5, Ad11 y Ad35. Los serotipos humanos se han catalogado en seis subgéneros (A-F) en base a un número de criterios biológicos, químicos, inmunológicos y estructurales.

45 Aunque los vectores basados en Ad5 se han usado en gran medida en un número de ensayos de terapia génica, pueden existir limitaciones en el uso de Ad5 y otros vectores adenovíricos del grupo C debido a inmunidad preexistente en la población general debido a infección natural. Ad5 y otros miembros del grupo C tienden a estar entre los serotipos más seropredominantes. La inmunidad a vectores existentes se puede desarrollar como resultado de la exposición al vector durante el tratamiento. Estos tipos de inmunidad preexistente o desarrollada a los vectores seropredominantes pueden limitar la eficacia de la terapia génica o los esfuerzos de vacunación. Los serotipos de adenovirus alternativos, de este modo constituyen dianas muy importantes en la búsqueda de sistemas de distribución de genes capaces de eludir la respuesta inmune del huésped.

Una de tales áreas mencionadas de serotipos alternativos son los derivados de primates no humanos, especialmente adenovirus de chimpancé. Véase la patente de Estados Unidos N.º 6.083.716 que describe el

genoma de dos adenovirus de chimpancé.

Se ha mostrado que los vectores adenovíricos de chimpancé ("Pan" o "C") inducen fuertes respuestas inmunes a productos transgénicos tan eficazmente como los vectores adenovíricos humanos (Fitzgerald y col., J. Immunol. 170: 1416).

5 Los adenovirus de primates no humanos se pueden aislar a partir de los nódulos linfáticos mesentéricos de chimpancés. Los adenovirus de chimpancé son suficientemente similares al subtipo C de adenovirus humanos para permitir la replicación de virus con supresión de E1 en células HEK 293. Incluso los adenovirus de chimpancé son filogenéticamente distintos de los serotipos humanos más comunes (Ad2 y Ad5). Pan 6 está menos estrechamente relacionado y es serológicamente distinto de los Pan 5, 7 y 9.

10 De este modo uno o más de los vectores adenovíricos se puede derivar de un adenovirus de primate no humano por ejemplo adenovirus de chimpancé tal como uno seleccionado de los serotipos Pan 5, Pan 6, Pan 7 y Pan 9.

Los vectores adenovíricos también se pueden derivar de más de un serotipo de adenovirus y cada serotipo puede ser de la misma o de diferente fuente. Por ejemplo se pueden derivar de más de un serotipo humano y/o de más de un serotipo de primate no humano. Los procedimientos para construir los vectores adenovíricos quiméricos se describen en el documento WO 2005/001103.

Existen ciertas restricciones de tamaño asociadas a la inserción de ADN heterólogo en adenovirus. Los adenovirus humanos tienen la capacidad de empaquetar hasta un 105 % de la longitud de genoma de tipo salvaje (Bett y col., 1993, J Virol 67 (10), 5911-21). El límite de empaquetamiento inferior para adenovirus humanos se ha mostrado que es el 75 % de la longitud del genoma de tipo salvaje (Parks y col 1995, J Virol 71 (4), 3293-8).

20 Un ejemplo de adenovirus útil en la presente invención son los adenovirus que son distintos de los serotipos de origen natural predominantes en la población humana tal como Ad2 y Ad5. Esto evita la inducción de potentes respuestas inmunes contra el vector que limita la eficacia de las administraciones posteriores del mismo serotipo bloqueando la captación de vector por neutralización del anticuerpo e influyendo en la toxicidad.

De este modo, el adenovirus puede ser un adenovirus que no sea un serotipo de virus humano de origen natural predominante. Los adenovirus aislados de animales tienen componentes de cápside, hexón, pentón y fibra inmunológicamente distintos pero están filogenéticamente estrechamente relacionados. Específicamente, el virus puede ser un adenovirus no humano, tal como un adenovirus de simio y en particular un adenovirus de chimpancé tal como Pan 5, 6, 7 o 9. Los ejemplos de tales cepas se describen en el documento WO 03/000283 y están disponibles de la Colección americana de Tipos de Cultivos, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 y de otras fuentes. Las cepas de adenovirus de chimpancé deseables son Pan 5 [ATCC VR-591], Pan 6 [ATCC VR-592] y Pan 7 [ATCC VR-593].

El uso de adenovirus de chimpancé se cree que es ventajoso con respecto al uso de serotipos de adenovirus humano debido a la falta de una inmunidad preexistente, en particular a la falta de anticuerpos de neutralización cruzada, frente a adenovirus en la población diana. La reacción cruzada de los adenovirus de chimpancé con respuestas de anticuerpo de neutralización preexistentes está solamente presente en el 2 % de la población diana comparado con el 35 % en el caso de ciertos vectores de adenovirus humanos candidatos. Los adenovirus de chimpancé son distintos de los subtipos humanos más comunes Ad2 y Ad5, pero están más estrechamente relacionados con Ad4 humano del subgrupo E, que no es un subtipo predominante. Pan 6 está menos estrechamente relacionado con Pan 5, 7 y 9.

40 El adenovirus de la invención puede ser deficiente en la replicación. Esto significa que tiene una capacidad reducida para replicarse en células no complementarias, comparado con el virus de tipo salvaje. Esto se puede producir mutando el virus por ejemplo suprimiendo un gen implicado en la replicación, por ejemplo supresión del gen E1a, E1b, E3 o E4.

Los vectores adenovíricos de acuerdo con la presente invención se pueden derivar del adenovirus de replicación defectuosa que comprende una supresión de E1 funcional. De este modo los vectores adenovíricos de acuerdo con la invención pueden ser de replicación defectuosa debido a la ausencia de la capacidad de expresar E1a y E1b adenovíricos, es decir, están funcionalmente suprimidos en E1a y E1b. Los adenovirus recombinantes también pueden llevar supresiones funcionales en otros genes [véase el documento WO 03/000283] por ejemplo, supresiones en los genes E3 o E4. El gen E3 temprano retrasado de adenovirus se puede eliminar de la secuencia de adenovirus que forma parte del virus recombinante. La función de E3 no es necesaria para la producción de la partícula de adenovirus recombinante. De este modo, no es necesario reemplazar la función de este producto génico con el fin de empaquetar un adenovirus recombinante útil en la invención. En una realización particular los adenovirus recombinantes han suprimido de manera funcional los genes E1 y E3. La construcción de tales vectores se describe en Roy y col., Human Gene Therapy 15: 519-530, 2004.

55 Los adenovirus recombinantes también se pueden construir para que tengan una supresión funcional del gen E4,

aunque puede ser deseable retener la función ORF6 de E4. Los vectores de adenovirus de acuerdo con la invención también pueden contener una supresión en el gen E2a temprano retrasado. Las supresiones también se pueden realizar en cualquiera de los genes tardíos L1 a L5 del genoma de adenovirus. Pueden ser útiles supresiones similares en los genes intermedios IX y IVa.

5 Se pueden realizar otras supresiones en otros genes de adenovirus estructurales o no estructurales. Las supresiones anteriores se pueden usar individualmente, es decir, una secuencia de adenovirus para uso en la presente invención puede contener supresiones de E1 solamente. Como alternativa, las supresiones de genes enteros o partes de los mismos eficaces para destruir su actividad biológica se pueden usar en cualquier combinación. Por ejemplo en un vector ejemplar, las secuencias de adenovirus pueden tener supresiones de los genes E1 y el gen E4, o de los genes E1, E2a y E3, o de los genes E1 y E3 (tales como supresiones funcionales en E1a y E1b y una supresión de al menos parte de E3), o de los genes E1, E2a y E4, con o sin supresión de E3 y así sucesivamente. Tales supresiones pueden ser supresiones parciales o totales de estos genes y se pueden usar en combinación con otras mutaciones, tales como mutaciones sensibles a temperatura para lograr un resultado deseado.

15 Los vectores adenovíricos se pueden producir en cualquier línea celular adecuada en la que el virus sea capaz de replicación. En particular, se pueden usar líneas celulares complementarias que proporcionan los factores desaparecidos del vector vírico que dan como resultado sus características de replicación alterada (tales como E1 y/o E4). Sin limitación, tal línea celular puede ser células HeLa [número de acceso de la ATCC CCL 2], A549 [número de acceso de la ATCC CCL 185], HEK 293, KB [CCL 17], Detroit [por ejemplo, Detroit 510, CCL 72] y WI-38 [CCL 75], entre otras. Estas líneas celulares están disponibles de la Colección Americana de Tipos de Cultivos, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209. Otras líneas celulares precursoras adecuadas se pueden obtener de otras fuentes, tales como células PER.C6 ®, como se representa por las células depositadas como ECACC N.º 96022940 en la Colección Europea de Cultivos de Células Animales (ECACC) en el Centro para Microbiología e Investigación Aplicada (CAMR, Reino Unido) o células Her 96 (Crucell).

25 La invención se extiende al uso de líneas celulares conocidas para la preparación de un vector vírico que codifica una proteína de la presente invención.

Las secuencias de polinucleótidos que codifican polipéptidos inmunógenos pueden ser de codón optimizado para células de mamíferos. Tal optimización de codón se describe en detalle en el documento WO 05/025614 por ejemplo, comenzando en la página 37.

30 En una realización de la presente invención en la que el vector vírico que comprende las construcciones de polinucleótidos en las que dichas construcciones comprenden una secuencia guía N-terminal. La secuencia señal, el dominio de transmembrana y el dominio citoplásmico están individualmente todos opcionalmente presentes o suprimidos. En una realización de la presente invención todas estas regiones están presentes pero modificadas.

35 Un promotor para usar en el vector adenovírico de acuerdo con la invención puede ser el promotor del gen HCMV IE, por ejemplo en el que la región no traducida en 5' del gen HCMV IE que comprende el exón 1 está incluida y el intrón A está completamente o parcialmente excluido como se describe en el documento WO 02/36792.

Cuando están fusionados varios antígenos en una proteína de fusión, tal proteína se codificaría por un polinucleótido sometido al control de un solo promotor.

40 En una realización alternativa de la invención, varios antígenos se pueden expresar por separado a través de promotores individuales, cada uno de dichos promotores puede ser igual o diferente. En todavía otra realización de la invención alguno de los antígenos puede formar una fusión, unida a un primer promotor y otro(s) antígeno(s) puede(n) estar unido(s) a un segundo promotor, que puede ser igual o diferente del primer promotor.

45 De este modo, el vector adenovírico puede comprender uno o más módulos de expresión cada uno de los cuales codifica un antígeno sometido al control de un promotor. Como alternativa o de manera adicional puede comprender uno o más módulos de expresión cada uno de los cuales codifica más de un antígeno sometido al control de un promotor, dichos antígenos se expresan por lo tanto como una fusión. Cada módulo de expresión puede estar presente en más de un locus en el vector adenovírico.

El polinucleótido o los polinucleótidos que codifica(n) polipéptidos inmunógenos a expresar se pueden insertar en cualesquiera de las regiones suprimidas de adenovirus, por ejemplo en la región de supresión de E1.

50 Aunque dos o más polinucleótidos que codifican polipéptidos inmunógenos pueden estar unidos como una fusión, la proteína resultante se puede expresar como una proteína de fusión, o se puede expresar como productos de proteína separados, o se puede expresar como una proteína de fusión y después posteriormente descomponerse en subunidades más pequeñas.

55 Inmunógeno en el contexto de esta memoria descriptiva se entiende que se refiere a la capacidad de inducir una respuesta inmune. Esta respuesta puede estar cuando la proteína se administra en una formulación apropiada, que

puede incluir/requerir un adyuvante adecuado. Una reinmunización que comprende una dosis similar o menor que la dosis original se puede requerir para obtener la respuesta inmunógena requerida (incluyendo reinmunización con una entidad diferente es decir reinmunización heteróloga).

5 La composición de acuerdo con la invención o las formulaciones farmacéuticas descritas en esta memoria descriptiva también pueden incluir en mezcla uno o más antígenos adicionales, tales como los derivados de *P. falciparum* y/o *P. vivax*, por ejemplo en los que el antígeno se selecciona entre DBP, PvTRAP, PvMSP2, PvMSP4, PvMSP5, PvMSP6, PvMSP7, PvMSP8, PvMSP9, PvAMA1 y RBP o fragmento de los mismos.

10 Otro ejemplo, los antígenos derivados de *P. falciparum* incluyen PfEMP-1, antígeno Pfs 16, MSP-1, MSP-3, LSA-1, LSA-3, AMA-1 y TRAP. Otros antígenos de *Plasmodium* incluyen EBA, GLURP, RAP1, RAP2, Secuestrina, Pf332, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs48/45, Pfs230 de *P. falciparum* y sus análogos en otros *Plasmodium* spp.

En la vacuna de la invención, se puede usar directamente una solución acuosa del antígeno híbrido. Como alternativa, la proteína con o sin liofilización anterior se puede mezclar o absorber con adyuvantes, que incluyen pero no se limitan a alumbre, muramil dipéptido, saponinas tales como Quil A.

15 Los adyuvantes particulares son los seleccionados entre el grupo de sales metálicas, emulsiones de aceite en agua, agonistas de receptores de tipo Toll, (en particular agonista del receptor 2 de tipo Toll, agonista del receptor 3 de tipo Toll, agonista del receptor 4 de tipo Toll, agonista del receptor 7 de tipo Toll, agonista del receptor 8 de tipo Toll y agonista del receptor 9 de tipo Toll), saponinas o combinaciones de los mismos con la condición de que las sales metálicas se usen solamente en combinación con otro adyuvante y no solas a menos que se formulen de tal forma que no se adsorba más de aproximadamente 60 % del antígeno sobre la sal metálica. Más específicamente, no más de aproximadamente el 50 %, por ejemplo el 40 % del antígeno se adsorbe sobre la sal metálica y en una realización no más de aproximadamente el 30 % del antígeno se adsorbe sobre la sal metálica. El nivel del anticuerpo adsorbido sobre la sal metálica se puede determinar mediante técnicas bien conocidas en la técnica. El nivel del antígeno libre se puede incrementar mediante, por ejemplo, la formulación de la composición en la presencia de iones fosfato, tal como solución salina tamponada con fosfato, o mediante el incremento de la relación de antígeno a sal metálica. En una realización el adyuvante no incluye una sal metálica como adyuvante exclusivo. En una realización el adyuvante no incluye la sal metálica.

20 En una realización el adyuvante es un ligando del receptor 4 de tipo Toll (TLR), por ejemplo un agonista tal como derivado de lípido A, en particular monofosforil lípido A o más específicamente monofosforil lípido A 3-desacilado (3D-MPL).

El monofosforil lípido A 3-desacilado se conoce a partir de la patente de Estados Unidos N.º 4.912.094 y la solicitud de la patente de Reino Unido N.º 2.220.211 (Ribi) y está disponible de Ribi Immunochem, Montana, Estados Unidos.

25 El 3D-MPL se vende con la marca registrada MPL ® por Corixa Corporation y principalmente promueve las respuestas de las células T CD4+ con un fenotipo IFN-g (Th1). Se puede producir de acuerdo con los procedimientos descritos en el documento GB 2 220 211 A. Químicamente es una mezcla del monofosforil lípido A 3-desacilado con 3, 4, 5 o 6 cadenas aciladas. En general en las composiciones de la presente invención se usa 3D-MPL de pequeña partícula. El 3D-MPL de pequeña partícula tiene un tamaño de partícula que se puede filtrar de manera esterilizante a través de un filtro de 0,22 pm. Tales preparaciones se describen en la Solicitud de Patente Internacional N.º WO 94/21292.

40 Los derivados sintéticos del lípido A se conocen y se cree que son agonistas de TLR 4 que incluyen pero no se limitan a:

OM174 (2-desoxi-6-O-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-o-fosfono-β-D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]-α-D-glucopiranosildihidrogenofosfato), (documento WO 95/14026).

45 **OM 294** DP (3S,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]-decan-1,10-diol,1,10-bis(dihidrogenofosfato), (documento WO 99/64301 y documento WO 00/0462).

OM 197 MP-Ac DP (3S,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]-decan-1,10-diol,1-dihidrogenofosfato 10-(6-aminohexanoato), (documento WO 01/46127).

50 Típicamente cuando se usa 3D-MPL el antígeno y 3D-MPL se distribuyen con alumbre o se presentan en una emulsión de aceite en agua o múltiples emulsiones de aceite en agua. La incorporación de 3D-MPL es ventajosa ya que es un estimulador de las respuestas de las células T efectoras. Como alternativa el 3D-MPL se puede formular como liposomas.

Otros ligandos TLR4 que se pueden usar son alquil glucosaminida fosfatos (AGP) tales como los descritos en el documento WO 9850399 o el documento US 6303347 (también se describen los procedimientos para la preparación de los AGP), o las sales farmacéuticamente aceptables de los AGP como se describen en el documento US

6764840. Algunos AGP son agonistas de TLR4 y algunos son antagonistas de TLR4. Ambos se cree que son útiles como adyuvantes.

Otro inmunoestimulante para uso en la presente invención es Quil A y sus derivados. Quil A es una preparación de saponina aislada del árbol sudamericano *Quilaja saponaria Molina* y se describió primero por tener actividad adyuvante por Dalsgaard y col., en 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. für die gesamte Virusforschung, vol. 44, Springer Verlag, Berlín, p 243-254). Los fragmentos purificados de que Quil A se han aislado mediante HPLC retienen la actividad adyuvante sin la toxicidad asociada a Quil A (documento EP 0362 278), por ejemplo QS7 y QS21 (también conocidos como QA7 y QA21). QS21 es una saponina natural derivada de la corteza de *Quilaja saponaria Molina* que induce células T citotóxicas CD8+ (CTL), células Th1 y una respuesta de anticuerpo IgG2a predominante.

Las formulaciones particulares de QS21 se han descrito y comprenden adicionalmente un esteroil (documento WO 96/33739). La relación QS21 : esteroil típicamente será del orden de 1 : 100 a 1 : 1 en peso.

En general está presente un exceso de esteroil, siendo la relación de QS21 : esteroil al menos 1 : 2 p/p. Típicamente para la administración humana QS21 y esteroil estarán presentes en una vacuna en el intervalo de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 µg, tal como aproximadamente 10 µg a aproximadamente 50 µg por dosis.

Los liposomas en general contienen un lípido neutro, por ejemplo fosfatidilcolina, que es usualmente no cristalina a temperatura ambiente, por ejemplo fosfatidilcolina de yema de huevo, dioleil fosfatidilcolina o dilauril fosfatidilcolina. Los liposomas también pueden contener un lípido cargado que incrementa la estabilidad de la estructura liposoma-QS21 para los liposomas compuestos por lípidos saturados. En estos casos la cantidad de lípido cargado es a menudo del 1-20 % p/p, tal como del 5-10 %. La relación de esteroil a fosfolípido es del 1-50 % (mol/mol), tal como del 20-25 %.

Estas composiciones pueden contener MPL (monofosforil lípido A 3-desacilado, también conocido como 3D-MPL). El 3D-MPL se conoce a partir del documento GB 2 220 211 (Ribi) como una mezcla de 3 tipos de monofosforil lípido A des-O-acilado con 4, 5 o 6 cadenas aciladas y está fabricado por Ribi Immunochem, Montana.

En general en las composiciones de la invención se emplea el 3D-MPL de pequeña partícula, que tiene un tamaño de partícula tal que se puede filtrar de manera esterilizante a través de un filtro de 0,22 µm. Tales preparaciones se describen en el documento WO 94/21292.

Las saponinas se pueden separar en la forma de micelas, micelas mixtas (en general, pero no exclusivamente con sales biliares) o pueden estar en forma de matrices ISCOM (documento EP 0 109 942 B1), liposomas o estructuras coloidales relacionadas tales como complejos multiméricos de tipo gusano o de tipo anillo o estructuras lipídicas/en capas y de laminillas cuando se formulan con colesterol y lípido, o en forma de una emulsión de aceite en agua (por ejemplo como en el documento WO95/17210). Las saponinas a menudo pueden estar asociadas a una sal metálica, tal como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio (documento WO 98/15287).

Usualmente, la saponina está presente en la forma de un liposoma, ISCOM o una emulsión de aceite en agua.

También se pueden usar oligonucleótidos inmunoestimuladores. Los ejemplos de oligonucleótidos para uso en adyuvantes o vacunas de la presente invención incluyen oligonucleótidos que contienen CpG, conteniendo en general dos o más motivos CpG dinucleotídicos separados por al menos tres, más a menudo al menos seis o más nucleótidos. Un motivo CpG es un nucleótido de citosina seguido de un nucleótido de guanina. Los oligonucleótidos CpG son típicamente desoxinucleótidos. En una realización el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o más preferiblemente un enlace fosforotioato, aunque los enlaces fosfodiéster y otros enlaces internucleótidos están dentro del alcance de la invención. También están incluidos dentro del alcance de la invención los oligonucleótidos con enlaces internucleótidos mixtos. Los procedimientos para producir oligonucleótidos fosforotioato o fosforoditioato se describen en los documentos US 5.666.153, US 5.278.302 y WO 95/26204.

Los ejemplos de oligonucleótidos son como sigue:

TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)
 TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)
 ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG
 TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)
 TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)
 TCG ACG TTT TCG GCG CGC GCC G (CpG 5456),

las secuencias pueden contener enlaces internucleótidos modificados de fosforotioato.

Como alternativa los oligonucleótidos CpG pueden comprender una o más secuencias anteriores que tienen supresiones o adiciones intrascendentes en ellas.

5 Los oligonucleótidos CpG se pueden sintetizar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica (por ejemplo véase el documento EP 468520). De manera conveniente, tales oligonucleótidos se pueden sintetizar utilizando un sintetizador automático.

10 Los ejemplos de un agonista TLR 2 incluyen péptidoglicano o lipoproteína. Las imidazoquinolinas, tales como Imiquimod y Resiquimod son agonistas de TLR7 conocidos. El ARN de una sola cadena es también un agonista de TLR conocido (TLR8 en seres humanos y TLR7 en ratones), mientras que el ARN de doble cadena y poli IC (ácido poliinosínico-policitidílico-un mimético sintético comercial de ARN vírico) son ejemplos de agonistas de TLR3. El 3D-MPL es un ejemplo de un agonista de TLR4 mientras que CpG es un ejemplo de un agonista de TLR9.

Como alternativa o además se puede incluir un inmunoestimulante. En una realización este inmunoestimulante será monofosforil lípido A 3-desacilado (3D-MPL).

15 Las combinaciones de adyuvantes incluyen 3D-MPL y QS21 (documento EP 0 671 948 B1), las emulsiones de aceite en agua que comprenden 3D-MPL y QS21 (documentos WO 95/17210, WO 98/56414), o 3D-MPL formulado con otros vehículos (documento EP 0 689 454 B1) que incluye liposomas. Otros sistemas de adyuvantes preferidos comprenden una combinación de 3D-MPL, QS21 y un oligonucleótido CpG como se describe en los documentos US 6558670 y US 6544518.

En un aspecto el adyuvante comprende 3D-MPL.

20 En un aspecto el adyuvante comprende QS21.

En un aspecto el adyuvante comprende CpG.

En un aspecto el adyuvante comprende QS21 y 3D-MPL.

En un aspecto el adyuvante comprende QS21, 3D-MPL y CpG.

En un aspecto el adyuvante se formula como una emulsión de aceite en agua.

25 En un aspecto el adyuvante se formula como liposomas.

En una realización de la presente invención se proporciona una vacuna que comprende una proteína de fusión híbrida de la invención, tal como CSV-S en combinación con 3D-MPL y un vehículo. Típicamente el vehículo será una emulsión de aceite en agua o alumbre. Más específicamente la proteína híbrida se presenta como una partícula o partícula mixta como se describe en esta memoria descriptiva.

30 La proteína de la presente invención también puede estar encapsulada en micropartículas tales como liposomas.

La preparación de vacunas se describe en general en New Trends and developments in Vaccines, editado por Voller y col., University Park press, Baltimore, Maryland, Estados Unidos, 1978. La encapsulación dentro de liposomas se describe, por ejemplo, por Fullerton, patente de Estados Unidos N.º 4.235.877.

35 La cantidad de la proteína de la presente invención presente en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos, significativos en las vacunas típicas. Tal cantidad variará dependiendo de qué inmunógeno específico se emplea y de si la vacuna está acompañada o no de adyuvante. En general, se espera que cada dosis comprenda 1-1000 µg de proteína, por ejemplo 1-200 µg tal como 10-100 µg, más particularmente 10-40 µg. Una cantidad óptima de la vacuna particular se puede determinar mediante estudios convencionales que implican la observación de titulaciones de anticuerpos y otras respuestas en sujetos. Después de una vacunación inicial, los sujetos recibirán preferiblemente una
40 reinmunización en aproximadamente 4 semanas, seguida de reinmunizaciones repetidas cada seis meses mientras que exista un riesgo de infección. La respuesta inmune a la proteína de esta invención se potencia mediante el uso de un adyuvante o un inmunoestimulante.

45 La cantidad de 3D-MPL usada es en general pequeña, pero dependiendo de la formulación de vacuna puede estar en la región de 1-1000 µg por dosis, en general 1-500 µg por dosis y más tal como entre 1 a 100 µg por dosis (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 µg por dosis).

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

La cantidad de saponina para uso en los adyuvantes de la presente invención puede estar en la región de 1-1000 µg por dosis, en general 1-500 µg por dosis, más tal como entre 1 a 250 µg por dosis y más específicamente entre 1 a 100 µg por dosis (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 µg por dosis).

5 En un aspecto adicional la invención proporciona una combinación de vacuna que proporciona inmunoprotección contra malaria provocada por *P. falciparum* y/o *P. vivax* que comprende una proteína híbrida de la invención derivada de la proteína CS de *P. vivax*.

En un aspecto se proporciona una vacuna que comprende partículas inmunógenas tal como se describe en esta memoria descriptiva y opcionalmente comprendiendo además partículas inmunógenas de TRS, S en mezcla (como se describe en el documento WO 93/10152) y un adyuvante inmunoestimulador apropiado.

10 Las formulaciones de la presente invención se pueden usar en el tratamiento para propósitos tanto profilácticos como terapéuticos.

De acuerdo con lo anterior la invención proporciona el uso de cualquier aspecto de la invención descrito en esta memoria descriptiva para el tratamiento, en particular una composición de vacuna como se ha descrito en esta memoria descriptiva para uso en medicina.

15 Un aspecto adicional de la presente invención es proporcionar un procedimiento para la preparación de la proteína híbrida de la invención, dicho procedimiento comprende la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína, en un huésped adecuado, preferiblemente una levadura y la recuperación del producto.

La invención también se extiende a procedimientos de preparación de una composición farmacéutica tal como vacunas que emplean uno o más aspectos descritos en esta memoria descriptiva.

20 También se describe un procedimiento de tratamiento de un paciente susceptible a infección por *Plasmodium* mediante la administración de una cantidad eficaz de una vacuna como se ha descrito en esta memoria descriptiva anteriormente.

La vacuna incluye una vacuna parenteral.

25 De este modo la invención se extiende al uso de los antígenos tales como proteínas de fusión híbridas y/o partículas lipoproteicas de la invención y las composiciones que comprenden las mismas para el tratamiento y uso particular en la fabricación de un medicamento para el tratamiento/prevención de la malaria, tal como malaria provocada por *P. vivax* y/o *P. falciparum*.

Las proteínas y/o vectores víricos que codifican las mismas se pueden administrar en regímenes de recuerdo de inmunización, por ejemplo como se describe específicamente en el documento WO 2004/037189.

30 En el contexto de esta memoria descriptiva "comprendiendo" o "que comprende" se ha de interpretar como "incluyendo" o "que incluye".

Los aspectos de la invención que comprenden ciertos elementos también se pretende que se extiendan a dichos aspectos "que constan" o "que constan esencialmente" de los elementos relevantes.

Ejemplos

35 Ejemplo 1

Descripción de la cepa Y1834

La cepa Y1834 recombinante de levadura expresa la proteína de fusión CSV-S. Consta de la cepa huésped DC5 de *Saccharomyces cerevisiae* transformada con el vector de expresión recombinante pRIT15546.

40 DC5 es una cepa de levadura de laboratorio (N.º de la ATCC 20820) con el siguiente genotipo: leu2-3, leu2-112, his3, can1-11. La doble mutación leu-2 permite la selección para la captación y mantenimiento del vector pRIT15546 que lleva una copia del gen LEU-2 funcional. Solamente aquellas células que llevan un vector con un gen LEU-2 se pueden desarrollar cuando la leucina está ausente del medio de cultivo.

45 El vector pRIT15546 es un vector de expresión episomal de levadura (vector basado en 2µ) que lleva el módulo de expresión de CSV-S. La expresión recombinante está dirigida por un promotor derivado del gen de la levadura TDH3 (expresión constitutiva). La construcción del vector pRIT15546 se detalla a continuación.

Construcción del vector pRIT15546.

Un gen sintético CSV, con un uso de codón apropiado para la expresión en levadura se construyó y se subclonó en el vector pUC57 (número de acceso Y14837 del GenBank/EMBL). El plásmido resultante pUC57/CSV y el vector de

CSV-S y el gen funcional HIS4.

El vector pRIT15607 es un vector de expresión integrador de *Pichia pastoris* que lleva el módulo de expresión de CSV-S. La expresión recombinante está dirigida por el promotor AOX1 inducible por metanol estrechamente regulado, fuerte. La construcción del vector pRIT15607 se detalla a continuación.

5 Construcción del vector pRIT15607.

El gen de fusión de CSV-S, presente en pRIT15546 se amplificó mediante PCR y se clonó en el vector intermedio pGEM-T Easy (Promega, N.º de catálogo A1360). Después de la verificación de secuencia el plásmido recombinante se digirió con las enzimas de restricción apropiadas y se clonó en el vector integrador de *Pichia pastoris* pHIL-D2. El vector de expresión final, después de la verificación de secuencia, se denominó pRIT15607 (Figura 5). La proteína de fusión CSV-S codificada por el plásmido pRIT15607 es casi idéntica a la secuencia detallada en la SEC ID N.º 17, salvo en que la metionina 2 está reemplazada por una valina (SEC ID N.º 19 y SEC ID N.º 20). La digestión de pRIT15607 con la endonucleasa NotI libera un fragmento lineal de 6816 pares de bases que se puede integrar en el genoma de levadura mediante recombinación homóloga en el locus AOX1 residente.

Transformación de la cepa GS115.

15 La cepa huésped GS115 se transformó con el plásmido recombinante pRIT15607. Antes de la transformación el vector integrador se restringió con *NotI* con el fin de liberar un fragmento lineal de ADN que lleva el módulo de expresión y el marcador selectivo HIS4. La restricción con *NotI* favoreció la integración en el locus AOX1. Las células transformadas se sembraron sobre placas selectivas de agar. Los clones integrantes de copias múltiples se seleccionaron mediante análisis de transferencia por puntos cuantitativo. Entre los clones seleccionados que tienen un alto número de copias de módulos de expresión de CSV-S integrados, uno de ellos que muestra el nivel de expresión más alto para la proteína recombinante CSV-S se seleccionó y proporcionó la designación oficial Y1840. Este clon lleva cuatro copias del gen de fusión CSV-S.

Expresión de la proteína recombinante

25 Se desarrolla Y1840 a 30°C, en medio mínimo YNB (Yeast Nitrogen Base disponible de Kracker Scientific Inc) suplementado con glicerol al 1 % como una fuente de carbono hasta una D.O. (620 nm) de aproximadamente 0,5 (en este caso 0,709). Después las células se recogen y se vuelven a suspender en el mismo volumen de medio YNB suplementado con metanol al 1 % como una fuente de carbono (como inductor) y se incubó a 30°C durante aproximadamente 16 horas.

Preparación de extractos

30 Se centrifugan las células inducidas por metanol, los sedimentos se vuelven a suspender en Tampón de rotura y se rompen mecánicamente (perlas de vidrio o prensa French). El extracto se centrifuga durante 5-10 minutos a 5000 rpm. La fracción sobrenadante se desarrolla sobre 12,5 % de SDS-PAGE.

Tampón de rotura: HPO₄Na₂ 60 mM
 H₂PO₄Na 40 mM
 35 SO₄Mg 1 mM
 KCl 10 mM
 Tween-20 0,5 %
 PMSF 2 mM

Concentración de células: 100 ml de cultivo (D O: 0,5) en 2,5 ml de tampón de rotura = concentración de
 40 una D.O. de 20 unidades/ml.

Clarificación del extracto bruto: extracto centrifugado 5-10 minutos/5000 rpm.

Detección de proteína recombinante

Los extractos clarificados se desarrollan sobre 12,5 % de SDS-PAGE, las proteínas se transfieren a membrana de nitrocelulosa y se someten a inmunotinción. Véase Figura 6.

45 Análisis de transferencia de Western:

Reactivo = Anticuerpo monoclonal anti-S de ratón (preparado por GSK Biologicals)-(dilución 1/250)

Anticuerpos Anti-S que están comercialmente disponibles se pueden sustituir por los empleados en este procedimiento. Como alternativa se pueden emplear anticuerpos anti-CSV, por ejemplo los conocidos como MR4 disponibles de NIH.

Proteína de fusión CSV-S:

5 Peso molecular teórico: 51762 Daltons.

 Peso molecular aparente: 55 kDa.

Ejemplo 3

Descripción de la cepa Y1835

10 La cepa Y1835 recombinante de levadura expresa de manera simultánea la proteína de fusión CSV-S y el antígeno S. La cepa Y1295 de *Saccharomyces cerevisiae*, que ya lleva cinco copias integradas de los módulos de expresión de S, se transformó con el vector de expresión integrador recombinante pRIT15582, obteniendo una cepa que coexpresa CSV-S y las proteínas S.

15 La cepa Y1295 se construyó en GSK mediante un procedimiento de transformación de múltiples etapas. La construcción de la cepa Y1295 está descrita en el documento WO 93/10152. La cepa Y1295 tiene el siguiente genotipo: leu2-3, leu2-112, gal1. La mutación leu-2 permite la selección para la captación del fragmento de ADN lineal derivado de pRIT15582 que lleva el módulo CSV-S y el gen LEU2 funcional.

 El vector pRIT15582 es un vector de expresión integrador de levadura (vector basado en Ty) que lleva el módulo de expresión de CSV-S. La expresión recombinante está dirigida por un promotor derivado del gen TDH3 de levadura (expresión constitutiva). La construcción del vector pRIT15582 se detalla a continuación.

20 Construcción del vector integrador pRIT15582.

 El material de partida usado construyendo el vector pRIT15582 era el plásmido de expresión pRIT15546 (figura 3). La construcción de este plásmido se describe en el ejemplo 1. La digestión de pRIT15546 con la endonucleasa HindIII libera un fragmento de ADN largo de 3706 pares de bases que corresponde al módulo de expresión CSV-S completo (pTDH3 + CSV-S + tARG3). Este fragmento de ADN *HindIII* (después de cargar con la ADN polimerasa de T4) se insertó en el vector integrador basado en Ty pRIT13144 en el único sitio de clonación *Sall* (restringido con *Sall*/tratado con T4). El plásmido resultante pRIT15582 contiene, además del módulo de expresión, el gen LEU2 de levadura como marcador selectivo (Fig. 8). La digestión de pRIT15582 con la endonucleasa *XhoI* libera un fragmento lineal de 8500 pares de bases mostrado en la figura 4 que se puede integrar en el genoma de levadura mediante la recombinación homóloga de los extremos libres con elementos Ty residentes.

30 Transformación de la cepa Y1295.

 La cepa Y1295 se transformó con el fragmento *XhoI* lineal de 8500 pares de bases (Fig. 9) con selección para las colonias Leu+ obteniendo una cepa que expresa las proteínas tanto S como CS-S. Se obtuvieron varios integrantes que contienen conjuntos de ambos módulos de expresión presentes en el genoma a diversas relaciones. Se seleccionó un transformante que lleva cuatro copias de módulos CSV-S y se le proporcionó la designación oficial Y1835.

Expresión de la proteína recombinante

 Se desarrolla Y1835 a 30°C, en medio mínimo **YNB** (Yeast Nitrogen Base disponible de Kracker Scientific Inc) hasta una D.O. (620 nm) de aproximadamente 0,5 (0,8). Después las células se recogen y se preparan los extractos celulares.

40 **Análisis de productos de expresión mediante inmunotransferencia**

Preparación de extractos

 Se vuelven a suspender las células en tampón de rotura y se rompen mecánicamente (perlas de vidrio). El extracto se centrifuga durante 5-10 minutos a 5000 rpm. La fracción sobrenadante se desarrolla sobre 12,5 % de SDS-PAGE 12,5%.

45 Tampón de rotura: Tampón de fosfato de Na 50 mM (pH: 7,5)
 EDTA 4 mM

0,5% de Tween-20

+ cóctel de inhibidor de proteasas (Completo/ROCHE)

Concentración de células: 100 ml de cultivo (D O: 0,5) en 2,5 ml de tampón de rotura = concentración de una DO de 20 unidades/ml.

- 5 Clarificación del extracto bruto: extracto centrifugado 5-10 minutos/5000 rpm.

Detección de proteína recombinante

Los extractos clarificados se desarrollan sobre 12,5% de SDS-PAGE, las proteínas se transfieren a membrana de nitrocelulosa y se someten a inmunotinción

Análisis de transferencia de Western (Fig. 10):

- 10 Reactivos: 1/ Anticuerpo monoclonal anti-S de ratón (preparado por GSK Biologicals)-(dilución 1/250)
2/ Anticuerpo monoclonal anti-CSV de conejo (proporcionado amablemente por WRAIR)-dilución 1/20.000.

Los anticuerpos S así como los anticuerpos Anti-*P. vivax*/CSP que están comercialmente disponibles se pueden sustituir por los empleados en este procedimiento.

15 **Referencias**

(1) Harford N, Cabezon T, Colau B, et al., "Construction and Characterization of a Saccharomyces Cerevisiae Strain (RIT4376) Expressing Hepatitis B Surface Antigen", Postgrad Med J 63, Supp. 2: 65-70, 1987.
 (2) Jacobs E, Rutgers T, Voet P, et al., "Simultaneous Synthesis and Assembly of Various Hepatitis B Surface Proteins in Saccharomyces cerevisiae", Gene 80: 279-291, 1989.
 (3) Vieira J and Messing J, "The pUC plasmids, an M13mp7-Derived System for Insertion Mutagenesis and Sequencing with Synthetic Universal Primers", *_ Gene 19: 259-268, 1982.
 (4) Hinnen A, Hicks JB, and Fink GR, "Transformation of Yeast", Proc Natl Acad Sci USA 75: 1929-1933, 1980.
 (5) Broach JR, Strathern JN, and Hicks JB, "Transformation in Yeast Development of a Hybrid Cloning Vector and Isolation of the CAN 1 Gene", Gene 8: 121-133, 1979.
 (6) Zhang H, et al., "Double Stranded SDNA Sequencing as a Choice for DNA Sequencing", Nucleic Acids Research 16: 1220, 1988.
 (7) Dame JB, Williams JL. Mc Cutchan TF, et al., "Structure of the Gene Encoding the Immunodominant Surface Antigen on the Sporozoites of the Human Malaria Parasite Plasmodium falciparum", Science 225: 593-599, 1984.
 (8) Valenzuela P, Gray P, Quiroga M, et al., "Nucleotide Sequences of the Gene Coding for the Major Protein of Hepatitis B Virus Surface Antigen", Nature 280: 815-819, 1979.
 (9) In SS, Kee-Hoyung L, Young RK, et al., " comparison of Immunological Responses to Various Types of Circumsporozoite Proteins of Plasmodium vivax in Malaria Patients of Korea", Microbiol. Immunol. 48(2): 119-123, 2004; Microbiol. Immunol. 2004; 48(2): 119-123.
 (10) Rathore D, Sacci JB, de la Vega P, et al., « Binding and Invasion of Liver Cells by Plasmodium falciparum Sporozoites", J. Biol. Chem. 277(9): 7092-7098, 2002. Rathore et al., 2002, J. Biol. Chem. 277, 7092-8

Listado de secuencias

SEC ID N.º 1

REGIÓN 1

20 **KLKQP**

SEC ID N.º 2

REGIÓN II PLUS

CSVTCG

SEC ID N.º 3

25 REPETICIÓN VK210

GDRAAGQPA

SEC ID N.º 4

REPETICIÓN VK210

GDRADGQPA

5 **SEC ID N.º 5**

REPETICIÓN VK210

GDRADGQAA

SEC ID N.º 6

REPETICIÓN VK210

10 **GNGAGGQPA**

SEC ID N.º 7

REPETICIÓN VK210

GDGAAGQPA

SEC ID N.º 8

15 REPETICIÓN VK210

GDRAA GQAA

SEC ID N.º 9

REPETICIÓN VK210

GNGAGGQAA

20 **SEC ID N.º 10**

REPETICIÓN VK247 PRINCIPAL

ANGAGNQPG

SEC ID N.º 11

Inserción de 12 aminoácidos

25 **GGNAANKKAEDA**

SEC ID N.º 12

Secuencia de nucleótidos de Pv-CS

**AcacattgCGGacataatgtagatttatctaaagctataaatttaaattggtgtaaac
ttcaataacgtagacgctagttcactcggggctgCG**

cacgtaggtcagtcctgctagcagggggcgcggtctcggggaaaaccagacgacgaa
gaaggtgatgctaaaaagaaaaaggacg
gtaaaaaagcggaacccaaaaatccaagggaaaataaattaaaacagcccggggatc
gcgcggatggtcaagcggcgggtaatggg
gcgggggggtcaaccagcgggggatcgcgcggctggtcagccagcgggggatcgcgcg
gctggtcagccagcgggggatggtgc
ggctggccaaccagcgggggatcgcgcggatggtcagccagcgggggatcgcgcgga
tggccaaccagcgggtgatcgcgcggct
ggccaagcggccggtaatggggcgggggggtcaagcggccgcgaacggagcggggaac
cagccagcggcggtaacgctgca
ataaaaaagcggaagatgcgggtggtaacgcggggcggtaatgcggggcggccaaggtc
agaacaacgaaggggctaatgcacaaa
cgaaaaatctgtcaaagaatatctcgataaagtccgcgctacagtagggacagaatg
gacgcatgctctgtaacatgtggtgtcgggg
acgcgtgcgcggccgtgtcaatgcgggctaacaaaaaccagaagatctcacgttaa
tgatctcgaaacggatgtctgcaca

SEC ID N.º 13

Secuencia de aminoácidos de la proteína Pv-CS

THCGHNVDSLKAINLNGVNFNNVDASSLGAAHVGQSASRGRGLGEN
PDDEEGDAKKKKGKKAEPKNPRENKLKQPGDRADGQAAGNGAGG
QPAGDRAAGQPAGDRAAGQPAGDGAAGQPAGDRADGQPAGDRADG
QPAGDRAAGQAAGNGAGGQAAANGAGNQPGGGNAANKKAEDAGG
NAGGNAGGQGQNNEGANAPNEKSVKEYLDKVRATVGTWTPCSVT
CGVGVRVRRRVNAANKKPEDLTLNDLETDVCT

5 **SEC ID N.º 14**

Repetición de tipo 2 secundaria

ANGAGDQPG

SEC ID N.º 15
GEN HÍBRIDO CSV

ACCCATGTGGTCACAATGTCGATTTGTCTAAGGCCATTAACCTGAACGGTGTAAATTC 60
 AACCAACGTCGATGCTTCTTCTTTAGGTGCCGCTCATGTTGGTCAATCTGCTTCAAGAGGT 120
 AGAGGTTTAGGTGAAAACCCAGACGACGAAGAAGGTGACGCTAAGAAGAAGAAGGACGGT 180
 AAGAAGGCCGAACCAAGAACCAAGAGAAAACAAGTTGAAACAACCAGGTGACAGAGCC 240
 GACGGACAAGCAGCTGGTAATGGTGCTGGAGGTCAACCAGCTGGTGACAGAGCTGCCGGT 300
 CAGCCTGCTGGTGATAGAGCTGCTGGACAACCTGCTGGAGACGGTGCCGCCGGTCAACCT 360
 GCTGGTGATAGAGCAGACGGACAACCAGCTGGTGACCGTGCTGACGGACAGCCAGCCGGC 420
 GATAGGGCTGCAGGTCAAGCCGCTGGTAACGGTGCCGGTGGTCAAGCTGCTGCTAACGGT 480
 GCTGGTAACCAACCAGGTGGTGGTAACGCTGCCAACAAGAAAGCTGAAGACGCTGGTGGT 540
 AATGCTGGAGGTAATGCAGGTGGTCAGGGTCAAAACAACGAAGGTGCTAACGCTCCAAAC 600
 GAAAAGTCTGTTAAGGAATACTTAGATAAGGTTAGAGCTACTGTCGGTACTGAATGGACT 660
 CCATGTTCTGTTACTTGTGGTGTCCGGTGTAGAGTTAGAAGAAGAGTTAACGCCGCTAAC 720
 AAGAAGCCAGAAGACTTGACTCTAAACGACTTGGAAACTGACGTTTGTACT 771

SEC ID N.º 16
Fusión CSV-S

Secuencia de nucleótidos

ATGATGGCTCCCGGGACCCATTGTGGTCACAATGTCGATTTGTCTAAGGCCATTAACCTG 60
 AACGGTGTAAATTTCAACAACGTCGATGCTTCTTCTTTAGGTGCCGCTCATGTTGGTCAA 120
 TCTGCTTCAAGAGGTAGAGGTTTAGGTGAAAACCCAGACGACGAAGAAGGTGACGCTAAG 180
 AAGAAGAAGGACGGTAAGAAGGCCGAACCAAGAACCAAGAGAAAACAAGTTGAAACAA 240
 CCAGGTGACAGAGCCGACGGACAAGCAGCTGGTAATGGTGCTGGAGGTCAACCAGCTGGT 300
 GACAGAGCTGCCGGTCAGCCTGCTGGTGATAGAGCTGCTGGACAACCTGCTGGAGACGGT 360
 GCCGCCGGTCAACCTGCTGGTGATAGAGCAGACGGACAACCAGCTGGTGACCGTGCTGAC 420
 GGACAGCCAGCCGGCGATAGGGCTGCAGGTCAAGCCGCTGGTAACGGTGCCGGTGGTCAA 480
 GCTGCTGCTAACGGTCTGGTAACCAACCAGGTGGTGGTAACGCTGCCAACAAGAAAGCT 540
 GAAGACGCTGGTGGTAATGCTGGAGGTAATGCAGGTGGTCAGGGTCAAAACAACGAAGGT 600
 GCTAACGCTCCAAACGAAAAGTCTGTTAAGGAATACTTAGATAAGGTTAGAGCTACTGTC 660
 GGTACTGAATGGACTCCATGTTCTGTTACTTGTGGTGTCCGGTGTAGAGTTAGAAGAAGA 720
 GTTAACGCCGCTAACAAAGAAGCCAGAAGACTTGACTCTAAACGACTTGGAAACTGACGTT 780
 TGTAATCCCGGGCCTGTGACGAACATGGAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTG 840
 CTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTCTTGTGACAAGAATCCTCACAAATACCGCAGAGTCTA 900
 GACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTCTAGGGGGATCACCCGTGTGCTTGGCCAAAAT 960
 TCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTACCAACCTCCTGTCTCCAATTTGTCTGGTTAT 1020
 CGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATATTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATC 1080
 TTCTTATTGGTCTTCTGGATTATCAAGGTATGTTGCCGTTTGTCTCTAATTCAGGA 1140
 TCAACAACAACCAATACGGGACCATGCAAAACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGCAACTCT 1200
 ATGTTTCCCTCATGTTGCTGTACAAAACCTACGGATGGAAATTGCACCTGTATCCCATC 1260
 CCATCGTCTCGGGCTTTCGAAAATACTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCTTGG 1320
 CTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCCCACTGTTTGGCTT 1380
 TCAGCTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCGTGAGTCCCTTT 1440
 ATACCGCTGTTACCAATTTCTTTTGTCTCTGGGTATACATTTAA 1485

5 **SEC ID N.º 17**

Secuencia de aminoácidos

MMAPGTHCGHNVDLKAINLNGVNFNNVDASSLGAAHVGQSASRGRGLGENPDDEEGDAK	60
KKKDGGKKAEPKNPRENKLKQPGDRADGQAAGNGAGGQPAGDRAAGQPAGDRAAGQPAGDG	120
AAGQPAGDRADGQPAGDRADGQPAGDRAAGQAAGNGAGGQAAANGAGNQPGGGNAANKKA	180
EDAGGNAGGNAGGQGNNEGANAPNEKSVKEYLDKVRATVGTWTPCSVTCGVGVRVRRR	240
VNAANKKPEDLTLNDLETDVCTPGFVTN MENITSGFLGPLLVLQAGFLLTRILTIPQSL	300
DSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNSHSPSCPPICPGYRWMCLRRFIIIFLFIILLCLI	360
FLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSTTTNTGPCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNCTCIFI	420
PSSWAFAYLWEWASVRFVSWLSLLVPFVQFVGLSPTVWLSAIWMMWYWGPSLYSIVSPF	480
IPLLPIFFCLWVYI	494

SEC ID N.º 18

Secuencia de nucleótidos del módulo de expresión de RTS y producto de traducción predicho de la proteína híbrida RTS-HBsAg. El producto de traducción iniciado desde el codón TDH3 ATG se muestra por debajo de la secuencia de ADN.

5

AAGCTTACCAGTTCTCACACGGAACACCACTAATGGACACAAATTCGAAATACTTTGACC
 CTATTTTCGAGGACCTTGTCACCTTGAGCCCAAGAGAGCCAAGATTTAAATTTTCCTATG
 ACTTGATGCAAATTCCTCAAAGCTAATAACATGCAAGACACGTACGGTCAAGAAGACATAT
 TTGACCTCTTAACTGGTTCAGACGCGACTGCCTCATCAGTAAGACCCGTTGAAAAGAACT
 TACCTGAAAAAACGAATATATACTAGCGTTGAATGTTAGCGTCAACAACAAGAAGTTTA
 ATGACGCGGAGGCCAAGGCAAAAAGATTCCTTGATTACGTAAGGGAGTTAGAATCATTTT
 GAATAAAAAACACGCTTTTTTCAGTTCGAGTTTATCATTATCAATACTGCCATTTCAAAGA
 ATACGTAAATAATTAATAGTAGTGATTTTCCTAACTTTATTTAGTCAAAAATTAGCCTTT

TAATTCTGCTGTAACCCGTACATGCCCAAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATATATAAC
 ATCGTAGGTGTCTGGGTGAACAGTTTATCCCTGGCATCCACTAAATATAATGGAGCTCGC
 TTTTAAGCTGGCATCCAGAAAAAAGAATCCCAGCACCAAAATATTGTTTTCTTCACC
 AACCATCAGTTCATAGGTCCATTCTCTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAG
 GCAAAAAACGGGCACAACCTCAATGGAGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACAC
 AAGCAATTGACCCACGCATGTATCTATCTCATTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGC
 TCTCTCTGATTGGAAAAAGCTGAAAAAAGGTTGAAACCAGTTCCTGAAATTATCC
 CCTACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTATTGATTGTAATCTGTAAATCTGTAAATCTAT
 TTCTTAACTTCTTAAATTCTACTTTTATAGTTAGTCTTTTTTTTAGTTTTAAACACCA
 AGAACTTAGTTTCGAATAAACACACATAAACAAACAAAATGATGGCTCCCGATCCTAATG
 MetMetAlaProAspProAsnA
 CAAATCCAAATGCAAACCCAAATGCAAACCCAAACGCAAACCCCAATGCAAATCCTAATG
 LaAsnProAsnAlaAsnProAsnAlaAsnProAsnAlaAsnProAsnAlaAsnProAsnA
 CAAACCCCAATGCAAATCCTAATGCAAATCCTAATGCCAATCCAAATGCAAATCCAAATG
 LaAsnProAsnAlaAsnProAsnAlaAsnProAsnAlaAsnProAsnAlaAsnProAsnA
 CAAACCCAAACGCAAACCCCAATGCAAATCCTAATGCCAATCCAAATGCAAATCCAAATG
 LaAsnProAsnAlaAsnProAsnAlaAsnProAsnAlaAsnProAsnAlaAsnProAsna
 CAAACCCAAATGCAAACCCCAATGCAAACCCCAATGCAAATCCTAATAAAAACAATCAAG
 LaAsnProAsnAlaAsnProAsnAlaAsnProAsnAlaAsnProAsnLysAsnAsnGlnG
 GTAATGGACAAGGTACAATATGCCAAATGACCCAAACCGAAATGTAGATGAAAATGCTA
 LysAsnGlyGlnGlyHisAsnMetProAsnAspProAsnAspProAsnArgAsnValAspGluAsnAlaA
 ATGCCAACATGCTGTAATAATAATAACGAAGAACCAAGTGATAAGCACATAGAAC
 snAlaAsnAsnAlaValLysAsnAsnAsnAsnGluGluProSerAspLysHisIleGluG
 AATATTTAAAGAAAAATAAAAAATTCTATTTCAACTGAATGGTCCCATGTAGTGTAACTT
 LnTyrLeuLysLysIleLysAsnSerIleSerThrGluTrpSerProCysSerValThrC
 GTGGAAATGGTATTCAAGTTAGAATAAAGCCTGGCTCTGCTAATAAACCTAAAGACGAAT
 YsGlyAsnGlyIleGlnValArgIleLysProGlySerAlaAsnLysProLysAspGluL
 TAGATTATGAAATGATATTGAAAAAATTTGTAAAATGGAAAAGTGCTCGAGTGTGT
 euAspTyrGluAsnAspIleGluLysLysIleCysLysMetGluLysCysSerSerValP
 TTAATGTCGTAATAGTCGACCTGTGACGAACATGGAGAACATCACATCAGGATTCCTAG
 HeAsnValValAsnSerArgProValThrAsnMetGluAsnIleThrSerGlyPheLeuG
 GACCCCTGCTCGTGTACAGGCGGGGTTTTCTGTTGACAAGAATCCTCACAAATACCGC
 LyProLeuLeuValLeuGlnAlaGlyPhePheLeuLeuThrArgIleLeuThrIleProG
 AGAGCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTCTAGGGGGATCACCCGTGTGTCTTG
 LnSerLeuAspSerTrpTrpThrSerLeuAsnPheLeuGlyGlySerProValCysLeuG
 GCCAAAATTCGCAGTCCCAACCTCCAATCACTACCAACCTCCTGTCTCCAATTTGTC
 LyGlnAsnSerGlnSerProThrSerAsnHisSerProThrSerCysProProIleCysP

CTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGCGTTTTATCATATTCCTCTTCATCCTGCTGCTAT
 RoGlyTyrArgTrpMetCysLeuArgArgPheIleIlePheLeuPheIleLeuLeuLeu
 GCCTCATCTTCTTATGGTTCTTCTGGATTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAA
 YsLeuIlePheLeuLeuValLeuLeuAspTyrGlnGlyMetLeuProValCysProLeuI
 TTCCAGGATCAACAACAACCAATACGGGACCATGCAAAACCTGCACGACTCCTGCTCAAG
 LeProGlySerThrThrThrAsnThrGlyProCysLysThrCysThrThrProAlaGlnG
 GCAACTCTATGTTTCCCTCATGTTGCTGTACAAAACCTACGGATGGAAATTGCACCTGTA
 LyAsnSerMetPheProSerCysCysCysThrLysProThrAspGlyAsnCysThrCysI
 TTCCCATCCCATCGTCTGGGCTTTCGCAAAATACCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTT
 LeProIleProSerSerTrpAlaPheAlaLysTryLeuTrpGluTrpAlaSerValArgP
 TCTCTTGGCTCAGTTACTAGTGCCATTTGTTTCTAGTGGTTCGTAGGGCTTCCCCACTG
 HeSerTrpLeuSerLeuLeuValProPheValGlnTrpPheValGlyLeuSerProThrV
 TTTGGCTTTCAGCTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCGTGA
 AlTrpLeuSerAlaIleTrpMetMetTrpTyrTrpGlyProSerLeuTyrSerIleValS
 GTCCCTTATACCGCTGTTACCAATTTCTTTTGTCTCTGGGTATACATTTAACGAATTC
 ErProPheIleProLeuLeuProIlePhePheCysLeuTrpValTyFin
 CAAGCTGAAACAATTCAAAGGTTTTCAAATCAATCAAGAACTGTCTCTGTGGCTGATCC
 AACTACAATTTATGCATTGTCTGCCAAGACATCAAGAAGAAGTTAGTGATGATGTCTT
 TTATGGAGAGCATTCCATAGTCTTTGAAGAAGCAGAAAACAGATTATATGCAGCTATGTC
 TGCCATTGATATCTTTGTTAATAATAAAGGTAATTTCAAGGACTTGAAATAATCCTTCTT
 TCGTGTCTTAATAACTAATATATAAATACAGATATAGATGCATGAATAATGATATACAT
 TGATTATTTGCAATGTCAATTAATAAAAAAAAAAATGTTAGTAAACTATGTTACATTCCA
 AGCAAATAAAGCACTTGGTTAAACGAAATTAACGTTTTTAAGACAGCCAGACCGCGGTCT
 AAAAAATTAAATATACACTGCCAACAAATTCCTTCGAGTTGTCCAATTTACCACTTTTA
 TATTTTCATCAACTTCAGCAGATTCAACCTTCTCACATAGAACATTGGAATAAACAGCCT
 TAACACCACTTTCAAGTTTGCACAGCGTAATATGAGGAATTTTGTGTTGACAACACAACC
 CTTTAATTTTCTCATGTTTTTCATCAATTATGCATCCATCTTTATCTTTAGACAGTTCCA
 CTACAATAGCAATAGTTTTTTCATCCCAACATAGTTTTTCGAGCCTAAAATTGAGTTTGT
 CGGTGTTTTTACCTGCGTATTTTGGTTATTACCAGAGCCTTGTGCATTTTCTATGCGGT
 TGTTATTGTAICTCGTTATCTGGTCAGTGTATCTGTTACAATATGATTCCACAACCTTTT
 TGCCCTTTTTTACGGGACGACATGACATGACCTAATGTTATATGAAGTTCTTCTGAAC
 TTTTCCACTAGCTAGTAAATGCTTGAATTTCTCAGTCAGCTCTGCATCGCTAGCAATACA
 CCTCTTGACCAATCAATAATTTTCATCGTAGTTTTCTATTTAGCTGAGATATATGTAGGT
 TTAATTAACCTTAGCGTTTTTGTGATTATTGTTGCCTTTACCAACTATTTTCTCACAG
 TAGGTTTGTAACTAAGCTCCTTCTGAACGCTGTCTCAATTTTCATCATCTTTCCGGATCT
CTGGTACCAAAATTGGATAAGCTT

SEC ID N.º 19

Gen de fusión CSV-S (clonado en el vector de expresión de *Pichia pastoris* integrador pHIL-D2)

Secuencia de nucleótidos

```

ATGGTTGCTCCCGGGACCCATTGTGGTCACAATGTCGATTTGTCTAAGGCCATTAAC TTG 60
AACGGTGTTAATTTCAACAACGTCGATGCTTCTTCTTTAGGTGCCGCTCATGTTGGTCAA 120
TCTGCTTCAAGAGGTAGAGGTTTAGGTGAAAACCCAGACGACGAAGAAGGTGACGCTAAG 180
AAGAAGAAGGACGGTAAGAAGGCCGAACCAAAGAACCCAAGAGAAAACAAGTTGAAACAA 240
CCAGGTGACAGAGCCGACGGACAAGCAGCTGGTAATGGTGTGGAGGTCAACCAGCTGGT 300
GACAGAGCTGCCGGTCAGCCTGCTGGTGATAGAGCTGCTGGACAACCTGCTGGAGACGGT 360
GCCGCCGGTCAACCTGCTGGTGATAGAGCAGACGGACAACCAGCTGGTGACCGTGCTGAC 420
GGACAGCCAGCCGGCGATAGGGCTGCAGGTCAAGCCGCTGGTAACGGTGGCGGTGGTCAA 480
GCTGCTGCTAACGGTGTGGTAACCAACCAGGTGGTGGTAACGCTGCCAACAAGAAAGCT 540
GAAGACGCTGGTGGTAATGCTGGAGGTAATGCAGGTGGTCAGGGTCAAAAACAACGAAGGT 600
GCTAACGCTCCAAACGAAAAGTCTGTTAAGGAATACTTAGATAAGGTTAGAGCTACTGTC 660
GGTACTGAATGGACTCCATGTTCTGTTACTTGTGGTGTGCGGTGTTAGAGTTAGAAGAAGA 720
GTTAACGCCGCTAACAGAAGCCAGAAGACTTGACTCTAACGACTTGAAACTGACGTT 780
TGTAATCCCAGGCGCTGTGACGAACATGGAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTG 840
CTCGTGTACAGGCGGGGTTTTTCTTGTGACAAGAATCCTCACAAATACCGCAGAGTCTA 900
GACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTCTAGGGGGATCACCCGTGTGTCTTGGCCAAAAT 960
TCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAACCTCCTGTCTCCAATTTGTCTGGTTAT 1020
CGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATATTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATC 1080
TTCTTATTGGTTCTTCTGGATTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCAGGA 1140
TCAACAACAACCAATACGGGACCATGCAAAACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGCAACTCT 1200
ATGTTTCCCTCATGTGCTGTACAAAACCTACGGATGGAAATGCACCTGTATTCCCATC 1260
CCATCGTCTGGGCTTTCGCAAAATACCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCTTGG 1320
CTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTTCAAGTGGTTCGTAGGGCTTCCCCACTGTTTGGCTT 1380
TCAGCTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCGTGAGTCCCTTT 1440
ATACCGCTGTTACCAATTTTCTTTTGTCTCTGGGTATACATTTAA 1485
    
```

SEC ID N.º 20

Proteína de fusión CSV-S expresada en *Pichia pastoris*

5 Secuencia de aminoácidos

```

MVAPGTHCGHNVDLSKAINLNGVNFNNVDASSLGAHVQASASRGRGLGENPDDEEGDAK 60
KKKDGKKAEPKNPRENKLKQPGDRADGQAAGNGAGGQPAGDRAAGQPAGDRAAGQPAGDG 120
AAGQPAGDRADGQPAGDRADGQPAGDRAAGQAAGNGAGGQAAANGAGNQPGGGNAANKKA 180
EDAGGNAGGNAGGQGNNEGANAPNEKSVKEYLQKVRATVGTEWTPCSVTGCVGVRVRRR 240
VNAANKKPEDLTLNDLETDVCTPGPVTNIMENITSGFLGPLLVLQAGFLLTRILTI PQSL 300
DSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNSHSPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIIFLIFLLCLI 360
FLLVLLDYQGMPLVCPPIPGSTTTNTGPKCTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNCTCIPI 420
PSSWAFAYLWEWASVRFWSLSLLVPFVQWVFLSPTVWLSAIWMMWYWGPSLYSIVSPF 480
IPLLPIFFCLWVYI 494
    
```

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión híbrida inmunógena que comprende:
 - a. al menos una unidad de repetición derivada de la región de repetición de una proteína de circumsporozoito de tipo I de *P. vivax*,
 - 5 b. al menos una unidad de repetición derivada de la región de repetición de una proteína de circumsporozoito de tipo II de *P. vivax*. y
 - c. antígeno S de superficie derivado del virus de Hepatitis B.
2. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proteína comprende además un fragmento del extremo N-terminal que comprende el fragmento conocido como región (I) mostrado en la SEC ID N.º 1.
- 10 3. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la proteína comprende además un fragmento del extremo C-terminal que comprende la sección conocida como región (II) mostrada en la SEC ID N.º 2.
4. Una proteína de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que la unidad de repetición de tipo I está seleccionada de uno o más monómeros mostrados en las SEC ID N.ºs 3 a 9.
5. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 4 que comprende al menos 9 unidades repetidas de tipo I.
- 15 6. Una proteína de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que la unidad de repetición de tipo II se selecciona entre uno o más monómeros mostrados en la SEC ID N.º 10 o la SEC ID N.º 14.
7. Una proteína de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende 1 repetición de tipo II.
8. Una proteína de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende además la inserción de 12 aminoácidos localizada en el final de la región de repetición encontrada en ciertas cepas asiáticas de *P. vivax*.
- 20 9. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 8, en la que los aminoácidos son los mostrados en la SEC ID N.º 11.
10. Una proteína de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que el antígeno S de hepatitis B se deriva de un serotipo adw.
11. Una proteína de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende además uno o más antígenos adicionales derivados de *P. falciparum* y/o *P. vivax*.
- 25 12. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el antígeno se selecciona de DBP, PvTRAP, PvMSP2, PvMSP4, PvMSP5, PvMSP6, PvMSP7, PvMSP8, PvMSP9, PvAMA1 y RBP.
13. Una proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende la secuencia de proteína de circumsporozoito híbrida como se muestra en la SEC ID N.º 13.
- 30 14. Una composición que comprende una proteína de fusión híbrida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y un adyuvante.
15. Una composición de acuerdo con la reivindicación 14, en la que el adyuvante comprende QS21 y 3D-MPL.
16. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, en la que el adyuvante está formulado como liposomas.
- 35 17. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, que comprende además uno o más antígenos adicionales derivados de *P. falciparum* y *P. vivax* en mezcla.
18. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, que comprende un tensioactivo.
- 40 19. Una composición de acuerdo con la reivindicación 18, en la que el tensioactivo se selecciona de Tween, brij, polietilenglicol.
20. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en la que la composición es una vacuna.
21. Una partícula lipoproteica multimérica que comprende una proteína híbrida según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

22. Una composición que comprende una partícula como se define en la reivindicación 21 y al menos un excipiente/vehículo.
23. Una composición de acuerdo con la reivindicación 22, que comprende además un adyuvante.
24. Una composición de acuerdo con la reivindicación 23, en la que el adyuvante comprende QS21 y 3D-MPL.
- 5 25. Una composición de acuerdo con la reivindicación 23 o 24, en la que el adyuvante se formula como liposomas.
26. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, que comprende además uno o más antígenos adicionales derivados de *P. falciparum* y/o *P. vivax* en mezcla.
27. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26, que comprende además un tensioactivo.
- 10 28. Una proteína como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20 o una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 27 para uso en tratamiento.
29. Uso de una proteína como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o de una partícula como se define en la reivindicación 21 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento/prevención de malaria.
- 15 30. Un uso de acuerdo con la reivindicación 29, en el que la malaria está provocada por *P. vivax*.
31. Una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
32. Un huésped que comprende una secuencia de nucleótidos como se define en la reivindicación 31.
33. Un procedimiento para la producción de una proteína como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, dicho procedimiento comprende la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína en un huésped adecuado y la recuperación del producto.
- 20 34. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 33, en el que el huésped es una levadura.
35. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 34, en el que el producto se recupera mediante lisis de las células huéspedes mediante tratamiento con una composición adecuada que comprende un tensioactivo.

FIG. 1. Microfotografía electrónica de las partículas de CSV-S producidas en la cepa Y1834

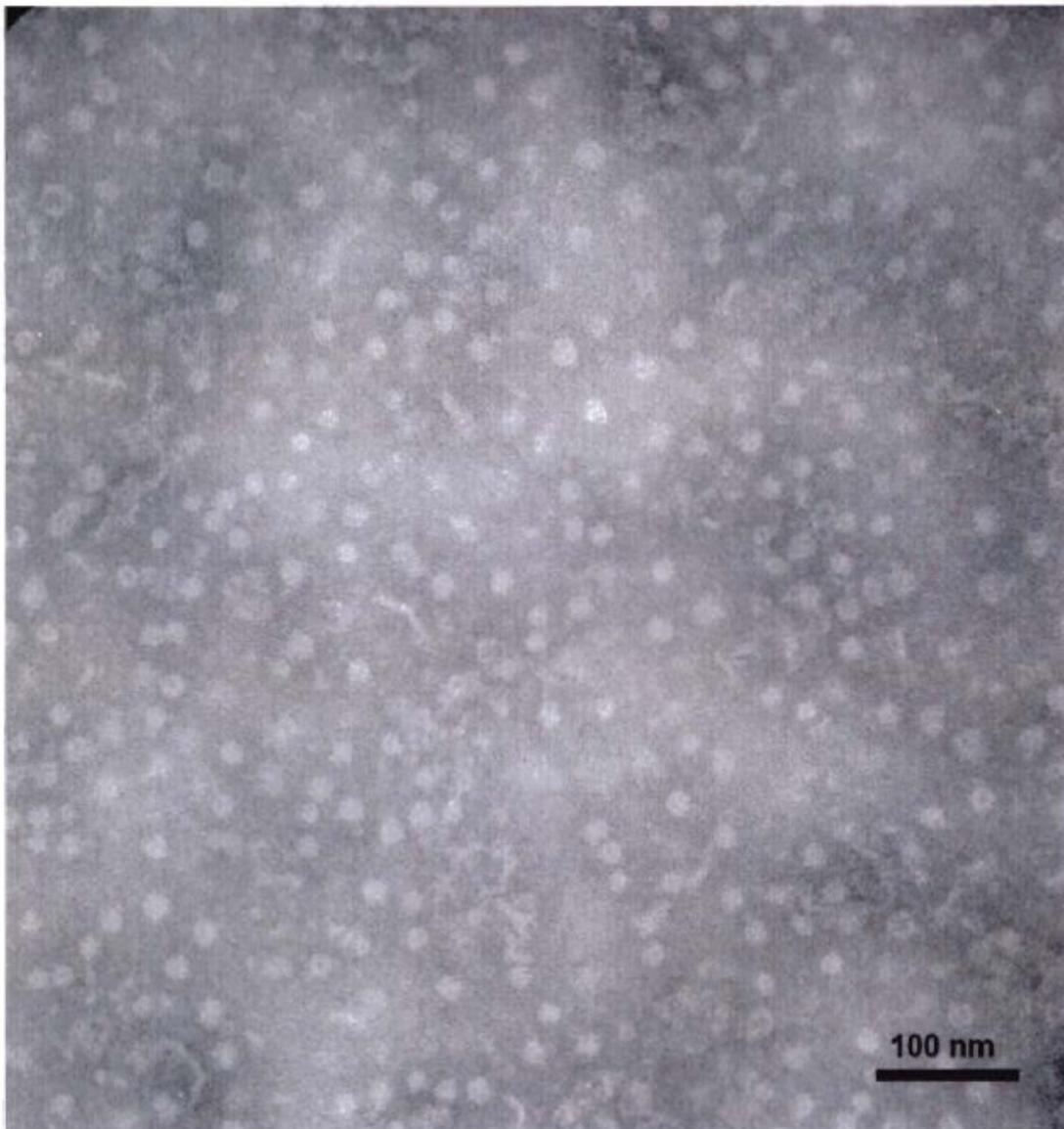
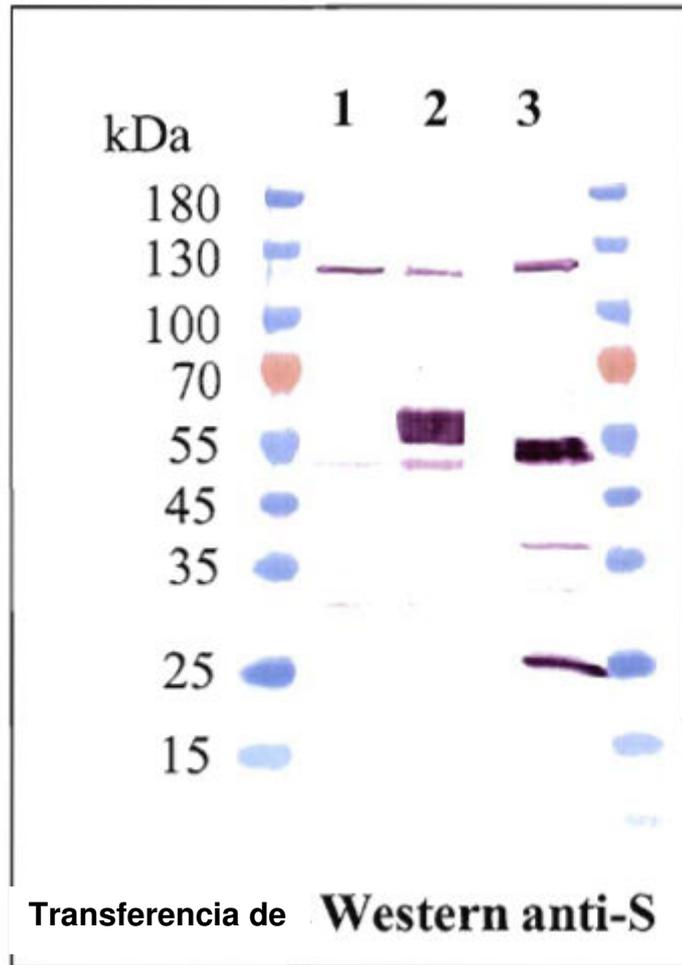


FIG. 2.

Minigel de tipo "Cambrex" al 4-20 %

15 µl de extracto clarificado/banda (+/- 50 µg de prot.)



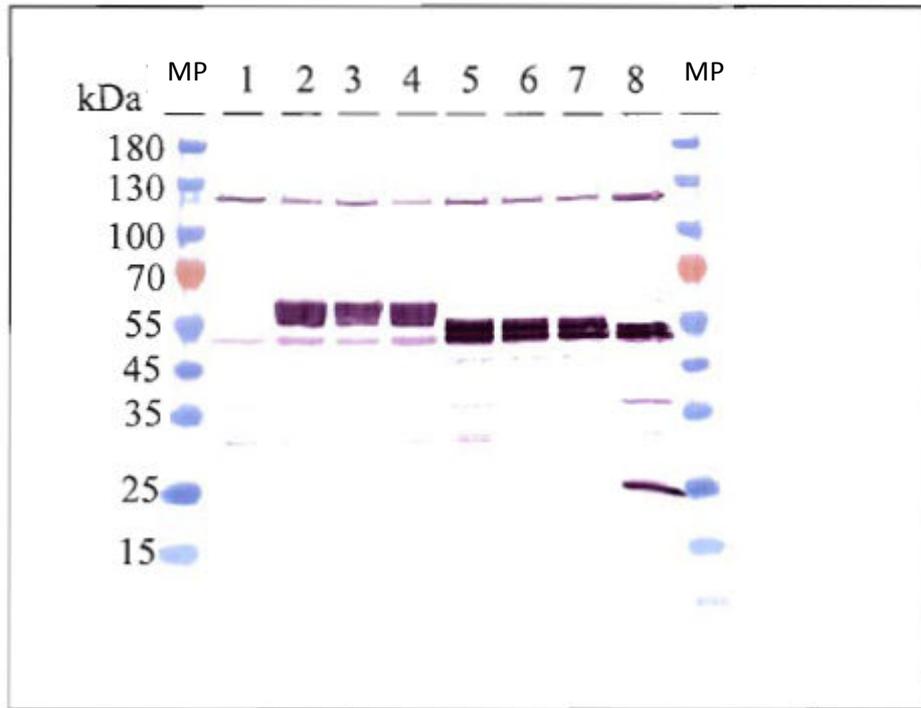
5

1: cepa huésped DC5 (control negativo)

2: Y1834 (CSV-S)

3: Y1631 (RTS, S)

FIG. 2a.



- 1) Cepa huésped DC5 (control negativo)
- 2) **Y1834 (CSV-S)**
- 3) clon n.º 2 (CSV-S)
- 4) clon n.º 3 (CSV-S)
- 5) clon n.º 1 (CSVtr-S)
- 6) clon n.º 2 (CSVtr-S)
- 7) clon n.º 3 (CSVtr-S)
- 8) Y1631 (RTS/S)

5

10

FIG. 3.

Mapa de plásmido de pRIT15546

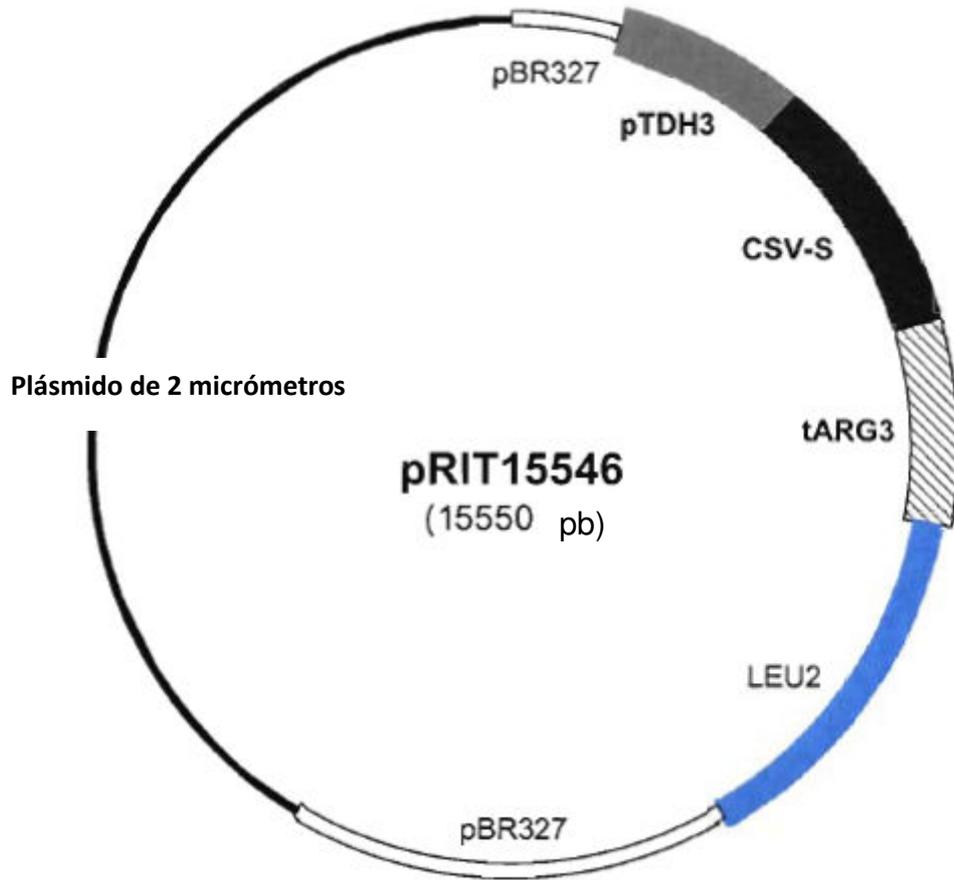
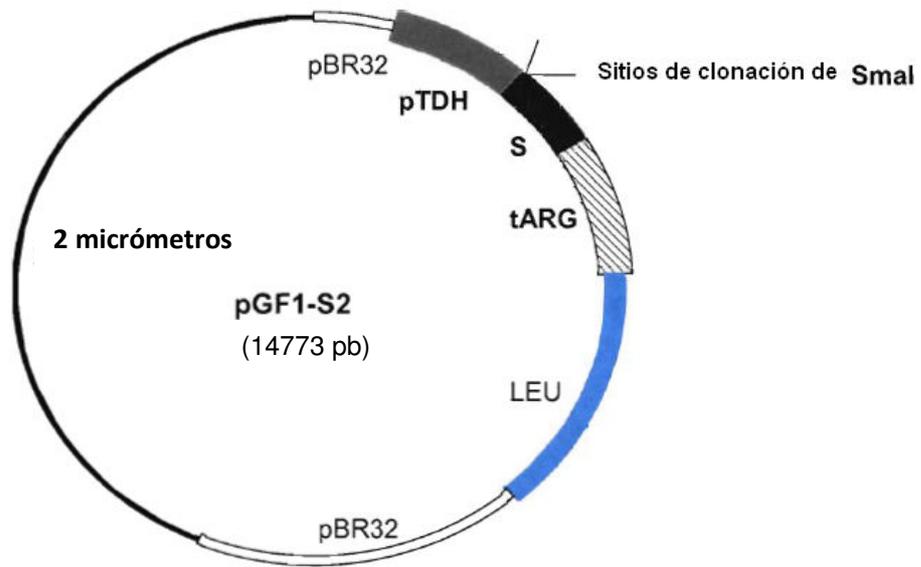


FIG. 4.



ATG ATG GCT CCC GGG ATC CTA CCC GGG CCT GTG ACG AAG ATG ...
 M M A P | G P V T N M
 SmaI SmaI ——— prés2 S ...

Figura 5: mapa de plásmido de pRIT 15607

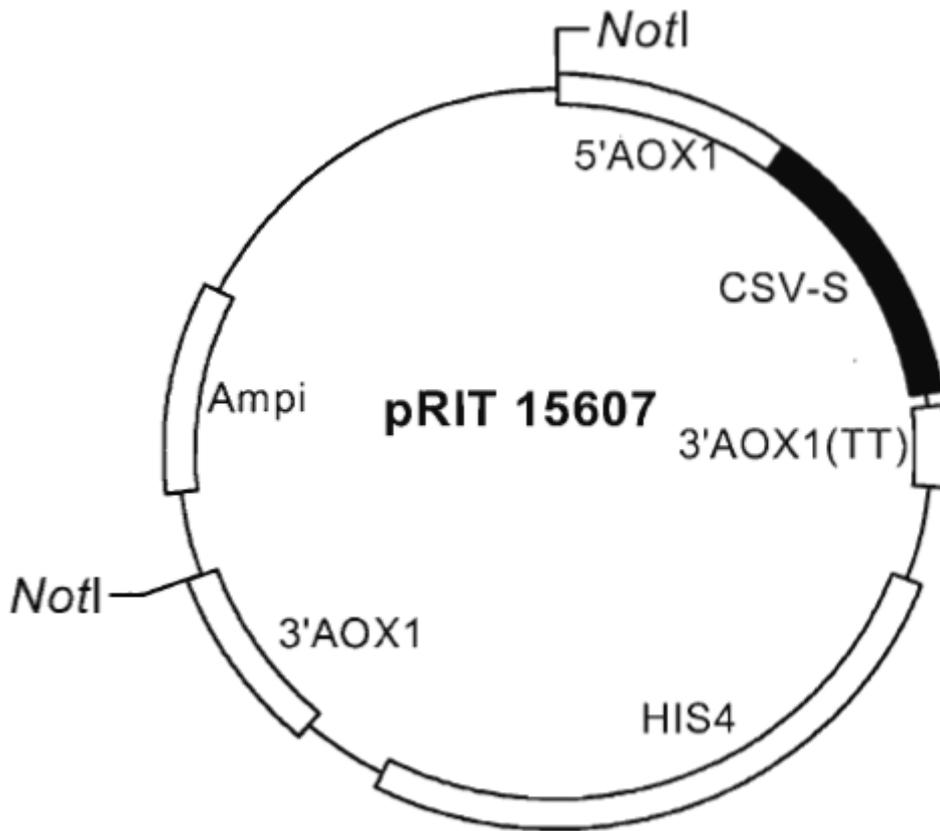


Figura 6: transferencia de Western de proteína recombinante expresada en la cepa Y1840

TW revelada con anticuerpo anti-S

La cantidad total de proteína cargada está entre paréntesis.

- 1: GS115 (célula huésped de *Pichia pastoris*)
- 5 2: Y1840 (100 µg)
- 3: Y1840 (50 µg)
- 4: Y1840 (25 µg)
- 5: Y1840 (12,5 µg)
- 6: Y1833 (100 µg, cepa de S.c. que expresa CSV-S)
- 10 7: Y1835 (100 µg, cepa de S.c. que coexpresa CSV-S y S)

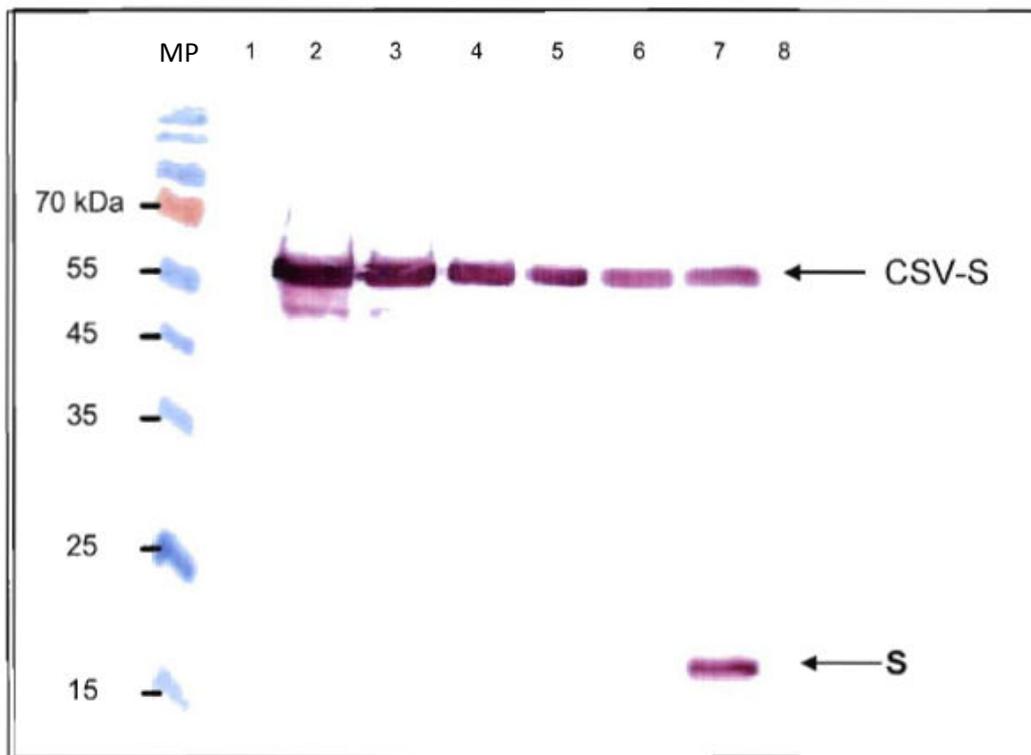


Figura 7: microfotografía electrónica de las partículas de CSV-S producidas en la cepa Y1840

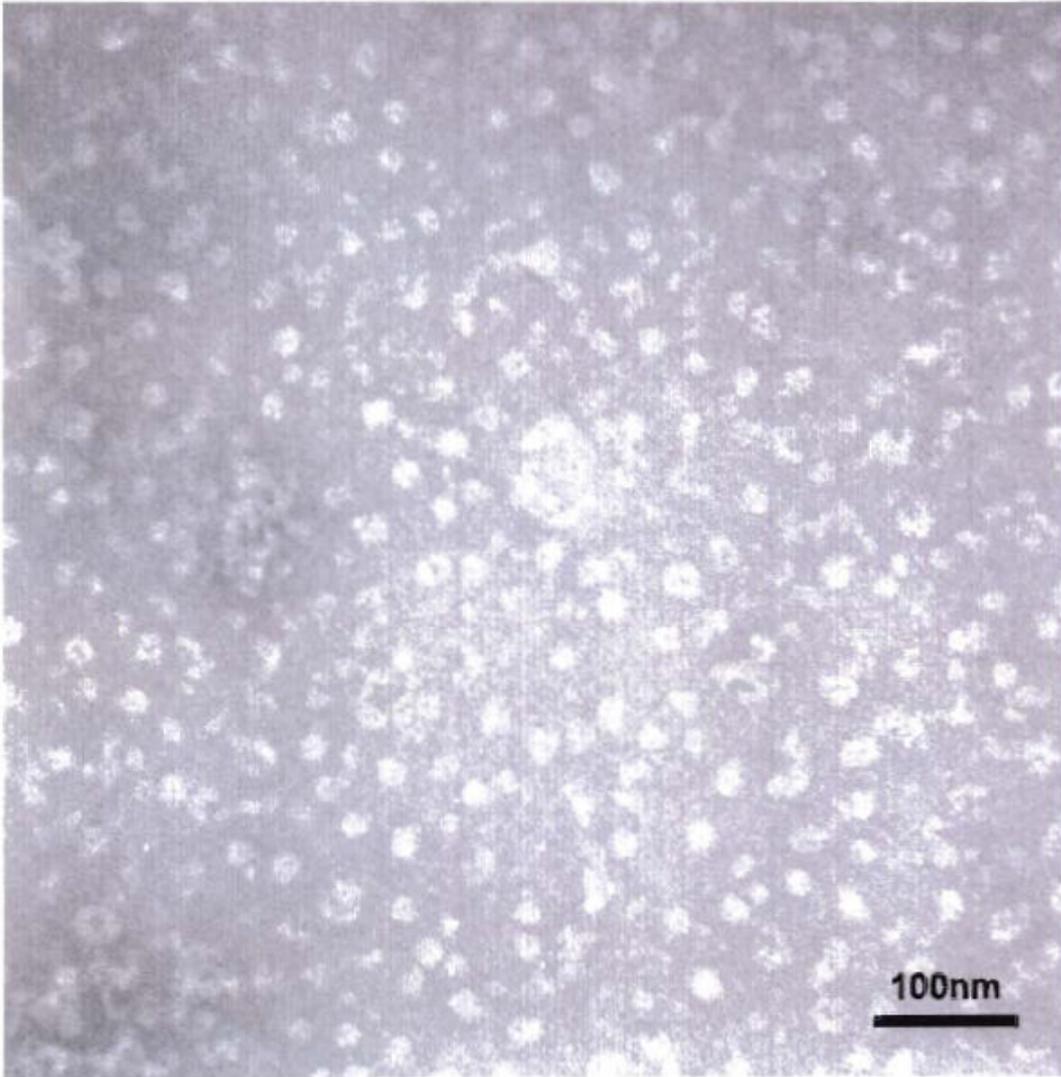


Figura 8: mapa del plásmido de pRIT15582.

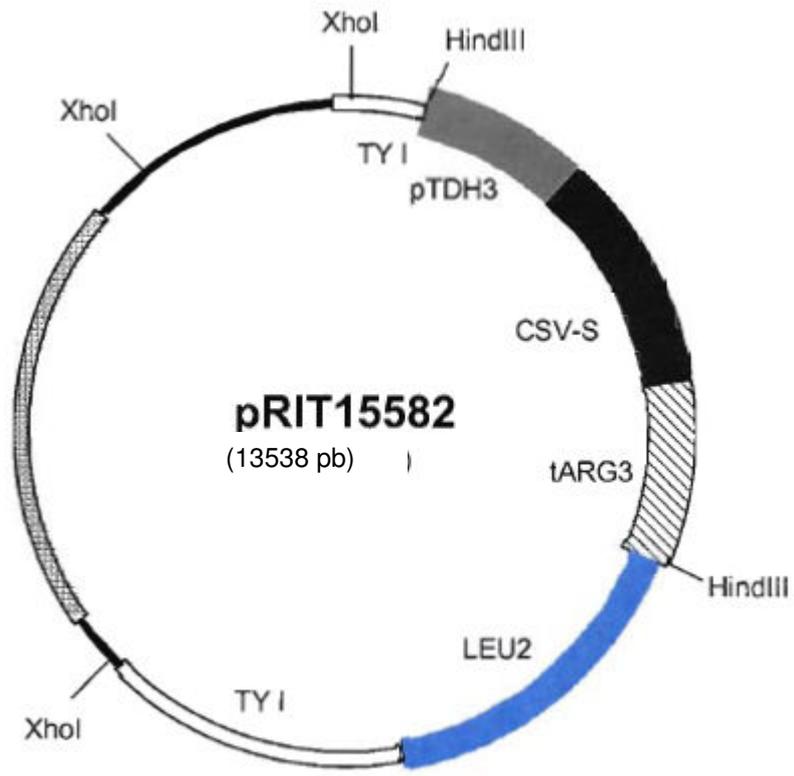


Figura 9: mapa de restricción del fragmento lineal XhoI usado para integrar el módulo CSV-S.

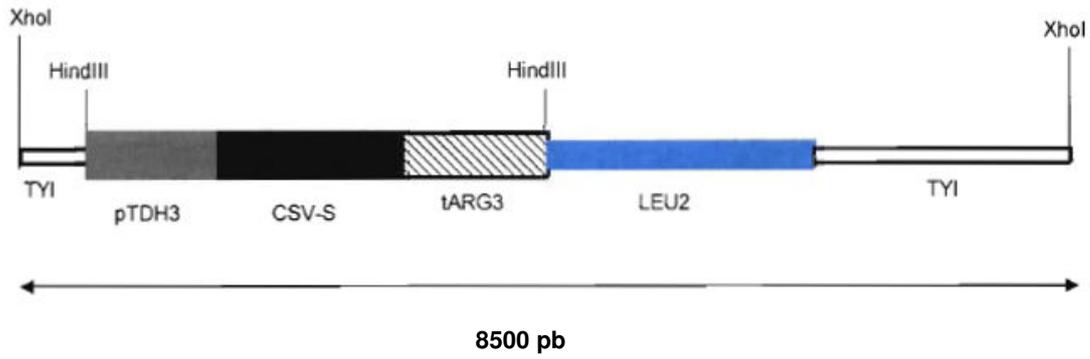


Figura 10: transferencia de Western de las proteínas recombinantes expresadas en la cepa Y1835.

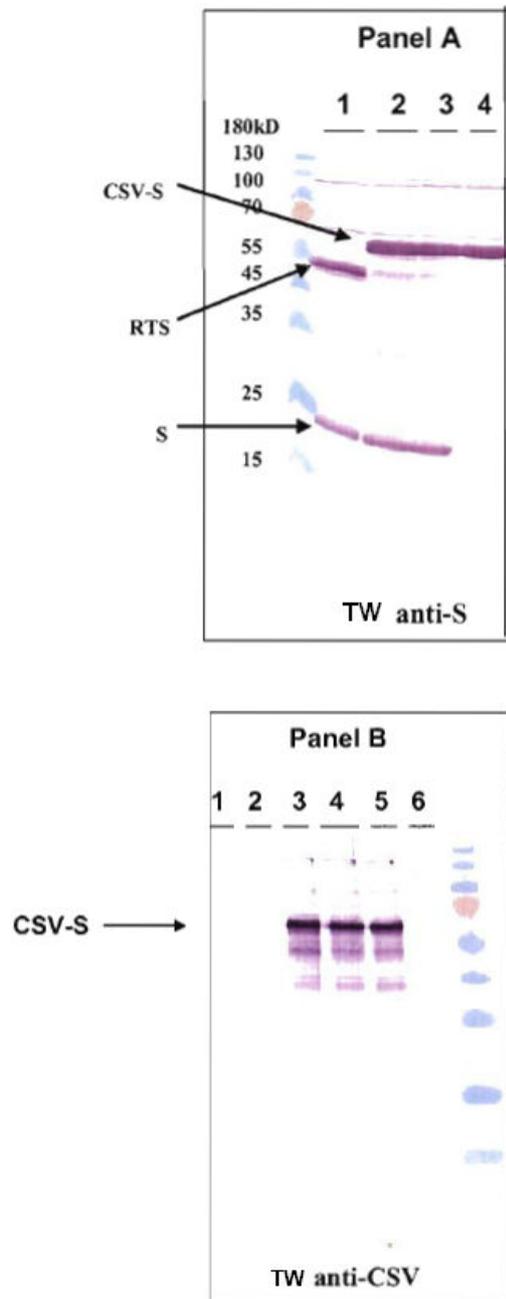


Figura 11: microfotografía electrónica de las partículas mixtas de CSV-S, S producidas en la cepa Y1835

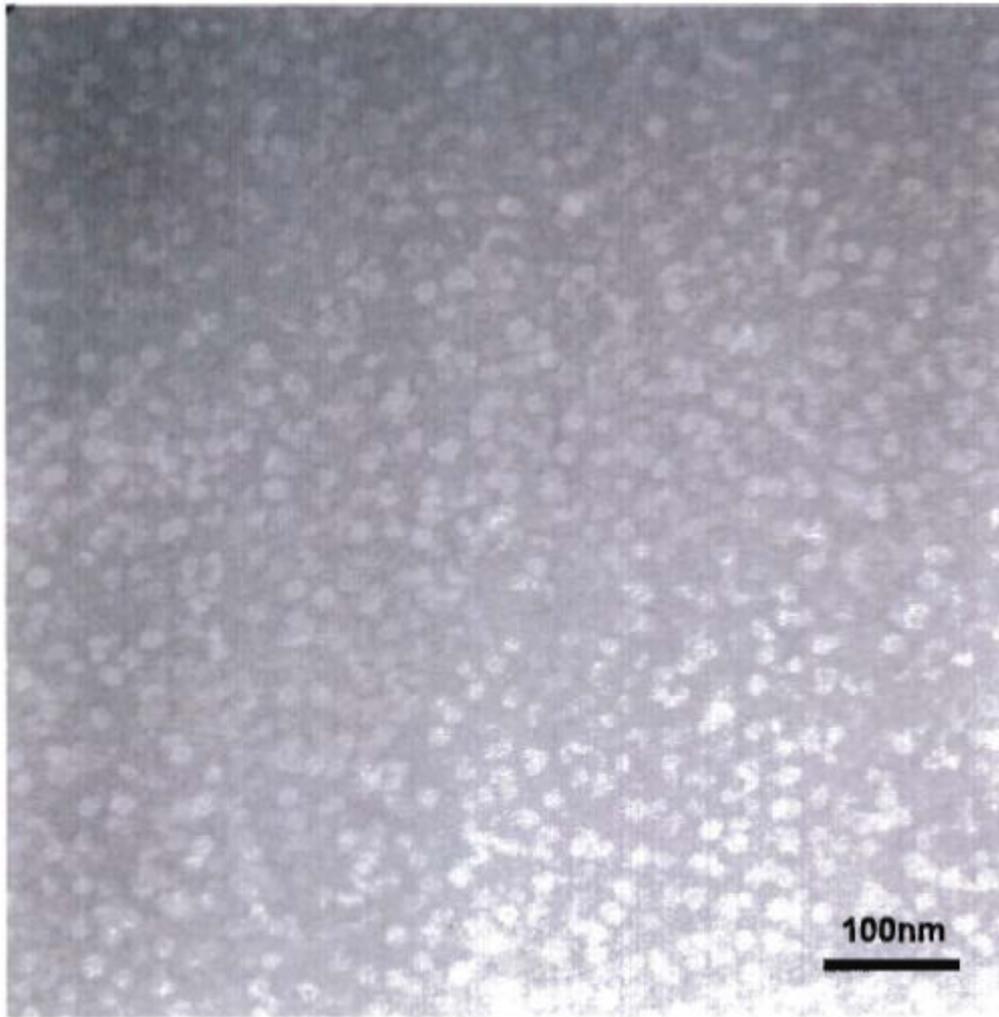


Figura 12

(SEC ID N.º 21)

```

          *           20           *           40           *           60           *
CSV-S   : MMAPGTHCGHNVDL SKAINLNGVNFNNVDASSLGA AHVQSA SRGRGLGENPDDEBEGDAK KKKDKGKAE PKNPRENKL :
78
CSVtr-S : MMAP-----AEPKNPRENKL :
15

          80           *           100          *           120          *           140          *
CSV-S   : KQPGDRADGQAAGNGAGGQPAGDRAAGQPAGDRAAGQPAGDGAAGQPAGDRADGQPAGDRADGQPAGDRAAGQAAGNG :
156
CSVtr-S : KQPGDRADGQAAGNGAGGQPAGDRAAGQPAGDRAAGQPAGDGAAGQPAGDRADGQPAGDRADGQPAGDRAAGQAAGNG :
93

          160          *           180          *           200          *           220          *
CSV-S   : AGGQAAANGAGNQPGGGNAANKKAEDAGGNAGGNAGGQGNNEGANAPNEKSVKEYL DKVRATVGTETWTPCSVT CGVG :
234
CSVtr-S : AGGQAAANGAGNQPGGGNAANKKAEDAGGNAGGNAGGQGNNEGANAPNEKSVKEYL DKVRATVGTETWTPCSVT CGVG :
171

          240          *           260          *           280          *           300          *
CSV-S   : VRVRRRVNAANKKPEDLTLNDLETDVCTPGPVTN MENITSGFLGPLLVLQAGFLLTRILTI PQSLDSWWTSLN FLGG :
312
CSVtr-S : VRVRRRVNAANKKPEDLTLNDLETDVCT -GPVTN MENITSGFLGPLLVLQAGFLLTRILTI PQSLDSWWTSLN FLGG :
248

          320          *           340          *           360          *           380          *
CSV-S   : SPVCLGQNSQSPTS NHSPSCPPICPGYRWMCLRRFIIIFL FILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPG STTTNTG PCK :
390
CSVtr-S : SPVCLGQNSQSPTS NHSPSCPPICPGYRWMCLRRFIIIFL FILLCLIFLLVLLDYQGMLPVCPLIPG STTTNTG PCK :
326

          400          *           420          *           440          *           460
CSV-S   : TCITPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNCTCIPSSWAF AKYLWEWASVRFSWLSLLVPFVQW FVGLSPTVWLSAIWMMWY :
468
CSVtr-S : TCITPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNCTCIPSSWAF AKYLWEWASVRFSWLSLLVPFVQW FVGLSPTVWLSAIWMMWY :
404

          *           480           *
CSV-S   : WGPSLYSIVSPFIPLLP IFFCLWVYI- : 494
CSVtr-S : WGPSLYSIVSPFIPLLP IFFCLWVYI- : 430
    
```