

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 732**

51 Int. Cl.:

A61K 39/015 (2006.01)

A61K 39/29 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2007 E 07787564 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 2040742**

54 Título: **Vacunas contra el paludismo**

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:

29.12.2014

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 D;
MARCHAND, MARTINE;
OCKENHOUSE, CHRISTIAN F y
YADAVA, ANJALI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 525 732 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 el paludismo

- 5 La presente invención se refiere a una nueva partícula de lipoproteína, a procedimientos para la preparación y purificación de la misma, a su uso en medicina, en particular en la prevención de infecciones de paludismo, a composiciones/vacunas que contienen la proteína, o a anticuerpos contra la partícula de proteína, tales como anticuerpos monoclonales o policlonales, y al uso de los mismos, en particular en terapia.
- 10 El paludismo es uno de los problemas de salud mayores del mundo, muriendo más de 2 a 4 millones de personas de la enfermedad cada año. Una de las formas más prevalentes de la enfermedad es provocada por el parásito protozoario *P. vivax*, que se encuentra en las regiones tropicales y sub-tropicales. Es interesante que el parásito puede completar su ciclo de mosquito a temperaturas tan bajas como de 15 grados Celsius, lo que ha permitido que la enfermedad se extienda en climas templados.
- Una de las formas más agudas de la enfermedad es provocada por el parásito protozoario *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), que es responsable de la mayor parte de la mortalidad que se puede atribuir al paludismo.
- 15 El ciclo de vida del *Plasmodium* es complejo, y requiere dos huéspedes, el hombre y el mosquito, para completarse. La infección del hombre se inicia a través de la introducción de los esporozoitos en la saliva de un mosquito infectado. Los esporozoitos migran hacia el hígado, y allí infectan a los hepatocitos, en donde se diferencian, por medio de la etapa intracelular exoeritrocítica, hasta la etapa de merozoitos, que infectan los glóbulos rojos sanguíneos (RBC) para iniciar la replicación cíclica en la etapa sanguínea asexual. El ciclo se completa mediante la diferenciación de un número de merozoitos en los glóbulos rojos sanguíneos hasta los gametocitos en etapa sexual, los cuales son ingeridos por el mosquito, en donde se desarrollan a través de una serie de etapas en el intestino medio para producir los esporozoitos que migran hacia la glándula salival.
- 20 Debido al hecho de que la enfermedad causada por *P. vivax* raramente es letal, los esfuerzos por prevenir y tratar el paludismo se han enfocado en la forma más mortal de la enfermedad provocada por *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*).
- 25 Aunque la enfermedad causada por *P. vivax* normalmente no da como resultado la muerte del paciente, debido al volumen de los casos, que parece estarse incrementando, al impacto significativo sobre la calidad de vida del paciente, a los crecientes reportes de incidencias severas de la enfermedad que da como resultado anemia y muerte, y al impacto económico, todavía se requiere una vacuna efectiva para la enfermedad. Adicionalmente, una sola vacuna capaz de proporciona protección contra ambas causas de la enfermedad sería conveniente.
- 30 Una característica del *P. vivax* es que algunas cepas son capaces de provocar una infección demorada al permanecer latentes en el hígado antes de surgir hacia la circulación periférica para manifestar los síntomas clínicos. Por consiguiente, los individuos, por ejemplo cuando viajan a través de un área infectada, pueden ser infectados y todavía pueden no exhibir los síntomas durante varios meses. Esto tiene el potencial de provocar la extensión de la enfermedad, y por esta razón, no se permite que las personas que viajan a las áreas infectadas donen sangre para transfusión durante un período de tiempo definido después de viajar hacia la región infectada.
- 35 La infección de paludismo por *P. vivax* sigue siendo latente dentro del hígado, mientras que el parásito está sufriendo la shizogonia pre-eritrocítica. Si se controla el parásito en esta etapa, antes de que escape hacia el hígado, no se observan síntomas clínicos de la enfermedad en el paciente.
- 40 La etapa de esporozoito de *Plasmodium* se ha identificado como un objetivo potencial de una vacuna de paludismo. Se ha demostrado que la vacunación con el esporozoito desactivado (irradiado) induce protección contra el paludismo humana experimental (Am. J. Trop. Med. Hyg 24: 297-402, 1975). Sin embargo, no ha sido posible fabricar prácticamente y logísticamente una vacuna para paludismo para la población en general basándose en esta metodología, empleando esporozoitos irradiados.
- 45 La proteína principal de la superficie del esporozoito se conoce como la proteína de circunsporozoito (proteína CS). Se piensa que está involucrada en la movilidad e invasión del esporozoito durante su paso desde el sitio inicial de inoculación por el mosquito hacia la circulación, en donde migra hacia el hígado.
- La proteína CS de las especies de *Plasmodia* se caracteriza por un dominio repetitivo central (región de repetición) flanqueado por fragmentos no repetitivos de amino (término N) y carboxilo (término C). El dominio central de *P. vivax* se compone de varios bloques de una unidad de repetición, en general de 9 aminoácidos en fila.
- 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°11). La función de ésta última no es conocida. Sin embargo, es hipotetizado por algunos, que estos aminoácidos pueden estar ligados al establecimiento demorado de los síntomas clínicos de la enfermedad, aunque esto no se ha investigado. Se piensa que el término N se caracteriza por una secuencia de 5 aminoácidos conocida como la región I (véase la SEC ID N°1). También se piensa que el término C se caracteriza por comprender una secuencia de 18 aminoácidos, conocida como la región II. Ésta última contiene un motivo adhesivo de células, que está altamente conservado entre toda la proteína CS de paludismo (véase la SEC ID N°2).
- Varios grupos han propuesto vacunas subunitarias basadas en la proteína del circunsporozoito. Dos de estas vacunas se han sometido a pruebas clínicas: una es un péptido sintético, y la otra es una proteína recombinante (Ballou et al., Lancet: i 1277 (1987) y Herrington et al., Nature 328:257 (1987)). Estas vacunas tuvieron éxito para estimular una respuesta anti-esporozoitos. No obstante, la magnitud de la respuesta fue decepcionante, debido a que algunas vacunas no respondían para nada. Adicionalmente, la ausencia de "refuerzo" de los niveles de anticuerpos después de las inyecciones subsiguientes, y los resultados de los ensayos de proliferación de los linfocitos in vitro, sugirieron que las células-T de la mayoría de estos voluntarios no reconocieron la repetición inmuno-dominante. No obstante, un voluntario vacunado en cada estudio no desarrolló la parasitemia.
- Los documentos WO 93/10152 y WO 98/05355 (y el correspondiente documento EP1623720) describen una vacuna derivada a partir de la proteína CS de *P. falciparum*, y parece que ha habido algún progreso hacia la vacunación contra *P. falciparum* empleando el planteamiento descrito en las mismas; véase también Heppner et al., 2005, Vaccine 23, 2243-50.
- La proteína CS en *P. falciparum* tiene una región de repetición central que está conservada. En contraste, se conocen cuando menos dos formas (designadas como VK210 o tipo I, y VK247 o tipo II) de la proteína CS de *P. vivax*. Esto hace más difícil identificar una construcción de la proteína CS con todas las propiedades deseadas, tales como inmunogenicidad, que proporcione una protección general contra *P. vivax*, independientemente del tipo específico de proteína CS, debido a que los anticuerpos dirigidos hacia la región de repetición central del tipo I no necesariamente reconocen a los epítomos sobre la región correspondiente del tipo II, y viceversa.
- Una proteína CS de *P. vivax* recombinante se expresó y se probó como una vacuna en las décadas de 1980-1990, con un éxito limitado (Collins et al., 1989. Am. J. Trop. Med. Hyg. 40, 455-64). Se ha hecho algún trabajo por desarrollar una vacuna basada en Péptidos de Múltiples Antígenos (MAP), empleando uno o más epítomos que estén reticulados (Nardelli y Tam, 1995, Pharm. Biotechnol. 6, 803-19).
- La presente invención proporciona una partícula antigénica para su uso en vacunas de paludismo, que se cree que produce una respuesta humoral, y también una respuesta inmunitaria celular. Se cree que la partícula antigénica induce la producción de anticuerpos contra la proteína CS de *P. falciparum* y *P. vivax*, tipo I y tipo II. El antígeno también puede inducir a las células auxiliares-T, por ejemplo, las células Th1 y/o Th2.
- De conformidad con lo anterior, la presente invención proporciona:
- 35 - una partícula de proteína inmunogénica que comprende los siguientes monómeros:
 - a. una proteína de fusión que comprende secuencias antigénicas de una proteína CS de *P. vivax*, y el antígeno S de la hepatitis B (CSV-S), y
 - b. una proteína de fusión que comprende secuencias antigénicas de la proteína CS de *P. falciparum*, y el antígeno S de la hepatitis B (RTS), y
 - 40 c. opcionalmente el antígeno S de la hepatitis B.
 - una composición que comprende la partícula anterior y un adyuvante,
 - la partícula o la composición anterior para su uso em medicina.
 - uso de la partícula o composición proteica anterior para la fabricación de un medicamento para el tratamiento/prevención del paludismo.
 - 45 - una partícula o una composición como se ha definido anteriormente para su uso en el tratamiento de un paciente susceptible a la infección por plasmodium, en particular como una vacuna.
 - un vector o plásmido que comprende una o más secuencias de ADN que codifica los componentes de una partícula como se ha definido anteriormente, en el que dicho vector o plásmido es adecuado para insertar dicho ADN en un huésped para fabricar la partícula o dicho vector o plásmido es capaz, en las condiciones adecuadas, de fabricar los

componentes que se ensamblan en la partícula.

- un huésped transformado con un vector o plásmido como se ha definido anteriormente.

- un huésped que comprende una o más secuencias de ADN que codifican los componentes de una partícula como se ha definido anteriormente, para fabricar la partícula.

- 5 - un proceso para la producción de una partícula como se ha definido anteriormente, en el que el proceso comprende expresar una secuencia de nucleótidos que codifica dichas proteínas en un huésped adecuado y recuperar el producto.

Listado de Secuencias

	SEC ID N°1	Región I en el término N.
	SEC ID N°2'	Región II en el término C.
10	SEC ID N°3-9	Diferentes unidades de repetición de la proteína CS tipo I.
	SEC ID N°10	Unidad de repetición mayor a partir de la proteína CS tipo II.
	SEC ID N°11	Aminoácidos adicionales encontrados en las cepas asiáticas.
	SEC ID N°12	Secuencia de nucleótidos de la proteína híbrida CSV (optimizada para su expresión en E. coli).
15	SEC ID N°13	Secuencia de aminoácidos de la proteína híbrida CSV.
	SEC ID N°14	Unidad de repetición menor a partir de la proteína CS tipo II.
	SEC ID N°15	Secuencia de nucleótidos para la proteína híbrida CSV (optimizada para su expresión en levadura).
	SEC ID N°16	Secuencia de nucleótidos para la proteína de fusión híbrida CSV-S.
20	SEC ID N°17	Secuencia de aminoácidos para la proteína de fusión híbrida CSV-S.
	SEC ID N°18	Secuencia de nucleótidos para un casete de expresión RTS y una proteína RTS,S predicha.

Figuras

	Figura 1	El mapa del plásmido para pRIT15546 es un vector episomal de levadura.
25	Figura 2	El mapa del plásmido de pGF1-S2 es un plásmido preparado por GSK empleada en la "fusión" del antígeno deseado con el antígeno S de la hepatitis B. La clonación de las secuencias de ADN heterólogas entre los sitios SmaI (después de la separación del fragmento de ADN de SmaI de 12 pares de bases) crea una fusión dentro del marco con el gen S.
30	Figura 3	Mapa del plásmido de pRIT15582. La digestión con XhoI libera un fragmento de ADN lineal de 8.5 kb que lleva el casete de expresión CSV-S más el marcador selectivo LEU2, que se utiliza para la inserción en el cromosoma de levadura.
	Figura 4	Mapa de restricción del fragmento XhoI lineal utilizado para integrar el casete CSV-S.
	Figura 5	Transferencia de tipo Western de las proteínas recombinantes expresadas en la cepa Y1835.

Panel A: WB revelado con el anticuerpo anti-S.

- 35 Muestras cargadas (100 microgramos de proteína total/pozo):
- 1: Y1631 (cepa productora de RTS,S, como comparación).
 - 2: Y1835
 - 3: Y1835

4: Y1834

Panel B: WB revelado con el anticuerpo anti-CSV.

Muestras cargas (100 microgramos de proteína total/pozo):

1: Y1631 (cepa productora de RTS,S, como una comparación).

5

2: Y1295

3: Y1835

4: Y1834

5: nr (otra construcción de CSVS).

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

10 Figura 6 Micrografía de electrones de partículas mixtas de CSV-S,S producidas en la cepa Y1835. Las partículas CSV-S,S se purificaron a partir de extractos celulares solubles (basándose en el proceso de purificación de RTS,S), y se sometieron al análisis en el microscopio de electrones. Las partículas se visualizaron después del tinte negativo con ácido fosfotúngstico. La escala es equivalente a 100 nanómetros.

15 Figura 7 Western blot de las proteínas recombinantes expresadas en la cepa Y1845. WB revelada con el anticuerpo anti-S.

La cantidad de proteína total cargada está entre paréntesis.

1: Y1835 (100 microgramos).

2: Y1631 (100 microgramos-cepa productora de RTS,S, como una comparación).

3: Y1845 (100 microgramos).

20

4: Y1845 (50 microgramos).

5: Y1845 (25 microgramos).

Figura 8 Análisis de densidad de CsCl de un extracto sin células preparado a partir de la cepa Y1845.

25 Por consiguiente, la proteína de fusión CSV-S empleada en la invención comprende: una porción derivada a partir de la proteína CS de *P. vivax* (CSV). Este antígeno de CSV puede ser una proteína nativa, tal como se encuentra en las proteínas CS tipo I de *P. vivax*, y/o como se encuentra en las proteínas tipo II de *P. vivax*. De una manera alternativa, la proteína CSV puede ser una proteína híbrida o una proteína quimérica que comprenda a los elementos de las proteínas CS tipo I y tipo II. Cuando la última se fusiona con el antígeno S, ésta será referida en el presente documento como una proteína de fusión híbrida.

30 CSV-S se utiliza en el presente documento como un término genérico para cubrir las proteínas de fusión que comprenden una secuencia/fragmento a partir de la proteína CS de *P. vivax*, y una secuencia/fragmento a partir del antígeno S de la hepatitis B.

RTS se utiliza en el presente documento como un término genérico para cubrir las proteínas de fusión que comprenden una secuencia/fragmento a partir de la proteína CS de *P. falciparum*, y una secuencia/fragmento a partir del antígeno S de la hepatitis B.

35 La proteína híbrida/quimérica comprenderá en general:

cuando menos una unidad de repetición derivada a partir de la sección de repetición central de una proteína de circunsporozoito tipo I de *P. vivax*, y

cuando menos una unidad de repetición derivada a partir de la sección de repetición central de una proteína de circunsporozoito tipo II de *P. vivax*.

40 En términos generales, la proteína híbrida también contendrá un fragmento en el término N a partir de la proteína CS de *Plasmodium*, tal como *P. vivax*, por ejemplo, un fragmento que comprenda la región I, tales como los aminoácidos

mostrados en la SEC ID N°1.

Usualmente, la proteína híbrida contendrá un fragmento en el término C a partir de la proteína CS de *Plasmodium*, tal como *P. vivax*, por ejemplo, un fragmento que comprenda la región II, tal como el motivo mostrado en la SEC ID N°2.

5 Aunque no deseamos quedar ligado a teoría alguna, se piensa que los fragmentos terminales N y C incluyen varios epítomos de células T y B.

Se puede emplear cualquier cepa adecuada de *P. vivax* en la invención, incluyendo: latina, américa (es decir, sal 1, Belem), Koreana, China, Tailandia, Indonesia, India, y Vietnam. La construcción en la SEC ID N°13 se basa en una cepa koreana (más específicamente, en una cepa de Corea del Sur).

10 *P. vivax* con las proteínas CS tipo I es más prevaleciente que *P. vivax* con las proteínas CS tipo II. Por consiguiente, en un aspecto, la invención emplea una proteína CS del tipo I. En un aspecto alternativo, la invención proporciona una proteína híbrida que comprende una unidad de repetición a partir del tipo I, y una unidad de repetición a partir del tipo II, por ejemplo, en donde se incluyen más unidades de repetición a partir del tipo I en el híbrido que unidades de repetición del tipo II.

15 De una manera más específica, la proteína híbrida de la invención puede incluir de 1 a 15 unidades de repetición, tal como 9 unidades de repetición, del tipo I.

Ejemplos de las unidades de repetición adecuadas a partir de las proteínas CS del tipo I se dan en las SEC ID N°3 a 9.

En una forma de realización, la invención proporciona un híbrido con una mezcla de diferentes unidades de repetición del tipo I, tal como una de cada una de aquellas enlistadas en las SEC ID N°3 a 9.

20 Una o más unidades de repetición se pueden duplicar en el híbrido, por ejemplo, se incorporar en la construcción dos unidades de repetición de la SEC ID N°3 y/o 4.

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

b) En un aspecto, la proteína CS comprende una unidad de la SEC ID N°4, opcionalmente en combinación con las unidades descritas en el párrafo a) directamente anterior.

25 c) En un aspecto, la proteína CS comprende una unidad de la SEC ID N°5, opcionalmente en combinación con las unidades descritas en el párrafo a) o b) directamente anteriores.

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

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

30 g) En un aspecto, la proteína CS comprende una unidad de la SEC ID N°8, opcionalmente en combinación con una o más unidades, como se describen en los párrafos a) a f) directamente anteriores.

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

35 Ejemplos de las unidades de repetición componentes adecuadas a partir de las proteínas CS tipo II, se dan en las SEC ID N°10 y 14, tal como 10.

La proteína híbrida puede incluir 5 o menos unidades de repetición derivadas a partir del tipo II, tal como una unidad de repetición, por ejemplo, como se muestra en la SEC ID N°10.

El híbrido puede también incluir la inserción de 12 aminoácidos que se encuentra en el extremo de la región de repetición encontrada en ciertas cepas asiáticas de *P. vivax*, por ejemplo como se muestra en la SEC ID N°11.

40 En una forma de realización, la proteína híbrida comprende aproximadamente 257 aminoácidos derivados de la proteína CS de *P. vivax*.

El componente de antígeno derivado de CSV de la invención se fusiona en general con el extremo amino-terminal de la proteína S.

Se cree que la presencia del antígeno superficial a partir de hepatitis B refuerza la inmunogenicidad de la porción de la

proteína CS, ayuda a la estabilidad, y/o asiste a la fabricación reproducible de la proteína.

En una forma de realización, la proteína de fusión híbrida comprende aproximadamente 494 aminoácidos, por ejemplo aproximadamente 257 de los cuales se derivan a partir de la proteína CS de *P. vivax*.

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

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

15 En una forma de realización, la proteína de fusión híbrida (CSV-S) tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°17. En la secuencia, los aminoácidos 6 a 262 se derivan a partir de CSV, y los aminoácidos 269 a 494 se derivan a partir de S. Los aminoácidos restantes se introducen mediante construcción genética (que se puede variar en particular como sea apropiado). Estos cuatro aminoácidos, Met, Met Ala Pro, se derivan específicamente a partir del plásmido pGF1-2 (véase la Figura 4).

Las propiedades de la proteína de fusión CSV-S de la SEC ID N°17 se proporcionan en las siguientes tablas:

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

Análisis de la composición de la proteína entera

Aminoácidos	Recuento numérico	% en peso	% en frecuencia
Cargados (RKHYCDE)	106	26,35	21,46
Ácidos (DE)	38	8,82	7,69

ES 2 525 732 T3

Básicos (KR)	39	10,68	7,89
Polar (NCQSTY)	134	28,15	27,13
Hidrofóbicos (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	25	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

La secuencia de nucleótidos para la proteína de la SEC ID N°17 se da en la SEC ID N°16.

5 El componente de las partículas de proteína de la invención denominado como RTS (es decir, derivado de *P. falciparum*), se puede preparar como se describe en la Publicación Internacional Número WO 93/10152, la cual incluye una descripción de RTS* (a partir de la cepa NF54/3D7 de *P. falciparum*).

En una o más forma de realizaciones de la invención, el antígeno derivado de *P. falciparum* empleado en la proteína de

fusión, puede ser sustancialmente la proteína CS entera del mismo.

En una forma de realización de la invención, se emplea el antígeno S de longitud completa. En otra forma de realización, se emplea un fragmento de este antígeno S.

5 En una forma de realización, el antígeno derivado de *P. falciparum* comprende cuando menos cuatro unidades de repetición de la región de repetición central. Más específicamente, este antígeno comprende una secuencia que contiene cuando menos 160 aminoácidos, la cual es sustancialmente homóloga a la porción C-terminal de la proteína CS. La proteína CS puede estar desprovista de los últimos 12 a 14 (tal como 12) aminoácidos del extremo C.

10 En particular, una proteína de fusión que comprende una porción de la proteína CS de *P. falciparum*, sustancialmente como la correspondiente a los aminoácidos 207 a 395 de la proteína CS de *P. falciparum* (cepa NF54[3D7]) 7G8 fusionada dentro del marco por medio de un enlazador lineal con el término N del antígeno S. El enlazador puede comprender una porción de preS2 a partir del antígeno S.

De una manera más específica, la proteína de fusión derivada a partir de *P. falciparum* empleada, es aquella codificada por la secuencia de nucleótidos para el casete de expresión de RTS, proporcionado en la SEC ID N°18.

15 Los antígenos S adecuados pueden comprender un preS2. Un ejemplo de un serotipo adecuado es adw (Nature 280:815-819, 1979).

20 En un aspecto, las proteínas de fusión híbridas de la invención comprenden una porción derivada a partir de una proteína S mutante, por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica publicada Número 2006/194196 (también publicada como la Publicación Internacional Número WO 2004/113369). Este documento describe una HDB05 marcada mutante. En particular, describe comparaciones de las proteínas mutante y de tipo silvestre en las Figuras 1 y 6, y de los genes para la mutante en las Figuras 4 y 5. Las secuencias 12 a 22 de la misma describen polipéptidos particulares de la proteína S mutante. Cada una de las anteriores se incorpora a la presente por referencia.

25 La proteína de fusión CSV-S, por ejemplo, se puede preparar empleando el plásmido pGF1-S2 (véase la Figura 2 y los ejemplos para detalles adicionales, que, cuando se inserta la secuencia apropiada correspondiente a CSV en el sitio de clonación Sam I, bajo condiciones adecuadas, puede producir la proteína de fusión CSV-S.

Las secuencias de ADN que codifican las proteínas de la presente invención, en una forma de realización, están flanqueadas por los elementos de control de transcripción, de preferencia derivados de los genes de levadura, e incorporados en un vector de expresión.

30 Por ejemplo, se puede construir un vector de expresión para las proteínas híbridas de la invención, de modo que comprenda las siguientes características:

- una secuencia promotora derivada, por ejemplo, del gen *TDH3* de *S. cerevisiae*.
- una secuencia que codifique para una proteína de fusión apropiada.
- una secuencia de terminación de la transcripción contenida dentro de la secuencia, derivada, por ejemplo, del gen *ARG3* de *S. cerevisiae*.

35 Un ejemplo de un promotor específico es el promotor a partir del gen *TDH3* de *S. cerevisiae*, Musti et al..

En el presente documento se describen vectores usados en la preparación de la proteína de fusión híbrida.

Después se puede emplear un plásmido adecuado para insertar la secuencia que codifique para la proteína de fusión híbrida en un huésped adecuado para la síntesis. Un ejemplo de un plásmido adecuado es pRIT15546, un vector basado en 2 micras para llevar un casete de expresión adecuado; véanse la Figura 1 y los Ejemplos para detalles adicionales.

40 El plásmido contendrá en general un marcador integrado para ayudar a la selección, por ejemplo un gen que codifique para la resistencia a antibióticos o LEU2, o la auxotrofia HIS.

En general, el huésped tendrá un casete de expresión para cada proteína de fusión en la partícula, y también puede tener uno o más casetes de expresión para el antígeno S integrado en su genoma.

45 La invención también se refiere a una célula huésped transformada con un vector de acuerdo con la invención. Las células huésped pueden ser procarióticas o eucarióticas, pero de preferencia son de levadura, por ejemplo *Saccharomyces* (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, tal como DC5, en la base de datos de ATCC (Número de

Acceso 20820), bajo el nombre de RIT DC5 cir(o). Depositante: Smith Kline-RIT), y levaduras que no sean *Saccharomyces*. Éstas incluyen *Schizosaccharomyces* (por ejemplo, *Schizosaccharomyces pombe*), *Kluyveromyces* (por ejemplo, *Kluyveromyces lactis*), *Pichia* (por ejemplo, *Pichia pastoris*), *Hansenula* (por ejemplo, *Hansenula polymorpha*), *Yarrowia* (por ejemplo, *Yarrowia lipolytica*) y *Schwanniomyces* (por ejemplo, *Schwanniomyces occidentalis*).

- 5 También se describe una cepa de levadura recombinante Y1834 (y el uso de la misma), para expresar la proteína de fusión; véanse los ejemplos para la preparación de la misma.

También se describe una cepa de levadura recombinante Y1835 o Y1845 (y el uso de la misma), para expresar la proteína de fusión de la invención; véanse los ejemplos para detalles adicionales.

- 10 Las secuencias de nucleótidos o partes de las mismas (tales como la porción que codifica la proteína CS/híbrida, pero opcionalmente no la porción que codifica la proteína S) empleadas en el presente documento, se pueden optimizar en los codones para su expresión en un huésped, tal como levadura.

También se describe un huésped que comprende un polinucleótido, tal como ADN que codifique para dos o más componentes de la partícula, empleado en la presente invención.

- 15 En un caso, la célula huésped comprende un casete de expresión para una proteína de fusión derivada a partir de *P. vivax*, y un casete de expresión para la proteína de fusión derivada a partir de *P. falciparum*.

En ciertos huéspedes, tales como en las células de levadura, una vez que se expresa la proteína de fusión (que comprende el antígeno S), se ensambla espontáneamente en una estructura/partícula de proteína compuesta de numerosos monómeros de dichas proteínas de fusión. Cuando la levadura expresa dos proteínas de fusión diferentes, se cree que éstas están coensambladas en partículas.

- 20 Cuando la cepa de levadura receptora seleccionada ya lleva en su genoma varias copias integradas de los casetes de expresión S de hepatitis B, entonces las partículas ensambladas también pueden incluir monómeros del antígeno S no fusionado.

Estas partículas también pueden ser referidas como Partículas Tipo Virus (VLP). Las partículas también se pueden describir como partículas de lipoproteína multiméricas.

- 25 De una manera alternativa, estas partículas se pueden preparar en un número de maneras, por ejemplo, mediante la fusión de cada uno de los antígenos derivados de *Plasmodium* con otro componente de fusión (por ejemplo, los antígenos del virus de hepatitis B, o una proteína estructural viral), y la expresión de los mismos en un huésped adecuado, tal como levadura o bacteria.

Por consiguiente, se proporciona una partícula de proteína inmunogénica que comprende los siguientes monómeros:

- 30 a. una proteína de fusión que comprende secuencias derivadas a partir de una proteína CS de *P. vivax*, y
b. una proteína de fusión que comprende secuencias derivadas a partir de una proteína CS de *P. falciparum*.

Adicionalmente se describe una proteína de fusión que comprende:

- 35 a) una secuencia derivada a partir de una proteína CS de *P. vivax* (tal como una secuencia a partir de la región de repetición del tipo I y/o del tipo II);
b) una secuencia derivada a partir de la proteína CS de *P. falciparum* (tal como una secuencia a partir de la región de repetición de la misma); y
c) una secuencia a partir del antígeno S de la hepatitis B.

- 40 Por consiguiente, una partícula de proteína puede comprender una proteína de fusión derivada de la proteína CS de *P. vivax*, y una proteína de fusión derivada a partir de la proteína CS de *P. falciparum*, en donde el antígeno utilizado con el antígeno de *Plasmodium* se selecciona de tal que se induzca la formación/el ensamble de las lipopartículas, cuando estas proteínas de fusión se expresen en un huésped adecuado.

Por lo tanto, en el presente documento se describe una VLP que comprende las unidades CSV-S y RTS. En un aspecto se describe una partícula que consiste esencialmente en las unidades CSV-S y RTS. En un aspecto alternativo, las partículas producidas comprenden o consisten esencialmente en las unidades CSV-S, RTS, y S.

- 45 Se pueden emplear diferentes planteamientos para diseñar la levadura para la preparación de estas partículas, por ejemplo, se puede insertar un casete de expresión para la proteína de fusión en el genoma de una levadura que ya

contenga un casete de expresión para una de las proteínas de fusión requeridas y/o el antígeno S. Sin embargo, una persona experta trabajando en este campo es capaz de preparar un huésped adecuado para la preparación de las partículas de acuerdo con la invención.

- 5 Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un huésped adecuado, tal como una levadura, que comprende ADN que codifica para CSV-S, RTS, y opcionalmente S. En un aspecto alternativo, un huésped adecuado es uno o más plásmidos capaces de expresar CSV-S, RTS, y opcionalmente S. Por ejemplo, el plásmido se puede utilizar para expresar la proteína en conjunto con, por ejemplo, una levadura.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se piensa que los tensoactivos utilizados para liberar la proteína de las células, también pueden ayudar en la estabilización de las partículas de lipoproteína.

- 10 Se postula la hipótesis de que las partículas de lipoproteína de la invención pueden contribuir a estimular adicionalmente la respuesta inmunitaria in vivo a la o las proteínas antigénicas.

En el presente documento se describe un vector viral deficiente en cuanto a la replicación que codifica una o más proteínas CS, por ejemplo, que corresponde a una o más proteínas CS comprendidas en las partículas de acuerdo con la invención.

- 15 Los vectores virales adecuados pueden derivar de vectores adenovirales, vectores virales adeno-asociados (AAVs), sarampión, lentivirus, alfa-virus, baculovirus, virus de herpes simple, y virus de viruela, tales como viruela de vacas, viruela de aves, viruela de pichones, viruela de canarios, viruela de especies, y viruela de ovejas/viruela de cabras. La metodología para la preparación de los vectores adenovirales que codifican un antígeno de paludismo, por ejemplo, se describe en el documento WO 2004/055187.

- 20 La proteína codificada por el vector, por ejemplo, se puede modificar para prevenir la glicosilación de la proteína durante la expresión, por ejemplo, ciertas serinas pueden ser reemplazadas por residuos de alanina para reducir la glucosilación.

Los vectores virales empleados en la invención pueden ser recombinantes.

Adenovirus

- 25 Los vectores adenovirales de uso en la presente invención comprenden uno o más polinucleótidos heterólogos (ADN), que codifican uno o más polipéptidos inmunogénicos.

Los vectores adenovirales útiles en el presente documento invención se pueden derivar a partir de un número de huéspedes mamíferos.

- 30 Los adenovirus (denominados en el presente documento "Ad" o "Adv") tienen una morfología característica con una capsida icosaédrica que consiste en tres proteínas mayores, hexon (II), base Penton (III), y fibra knobbed (IV), junto con un número de otras proteínas menores, 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 covalentemente al término 5', que tiene repeticiones terminales invertidas (ITR). El ADN del virus se asocia íntimamente con la proteína VII altamente básica, y un péptido pequeño denominado como mu. Otra proteína, V, se empaqueta con este complejo de ADN-proteína, y proporciona un enlace estructural con la capsida por medio de la proteína VI. El virus también contiene una proteasa codificada por el virus, que es necesaria para procesar algunas de las proteínas estructurales, con el fin de producir el virus infeccioso maduro.

- 35 Se han aislado más de 100 serotipos distintos de adenovirus, los cuales infectan a diferentes especies de mamíferos, 51 de los cuales son de origen humano. Por consiguiente, uno o más de los vectores adenovirales se pueden derivar a partir de un adenovirus humano. Los ejemplos de estos adenovirus derivados de ser humano son Ad1, Ad2, Ad4, Ad5, Ad6, Ad11, Ad 24, Ad34, Ad35, Ad50/51 en particular Ad5, Ad11 y Ad35. Los serotipos humanos se han caracterizado en seis subgéneros (A-F), basándose en un número de criterios biológicos, químicos, inmunológicos, y estructurales.

- 40 Aunque los vectores basados en Ad5 se han utilizado extensamente en un número de estudios de terapia génica, puede haber limitaciones sobre el uso de Ad5 y otros vectores adenovirales del grupo C, debido a la inmunidad previamente existente en la población general, debido a la infección natural. Se puede desarrollar inmunidad a los vectores existentes como un resultado de la exposición al vector durante el tratamiento. Estos tipos de inmunidad previamente existente o desarrollada a los vectores seroprevalentes, pueden limitar la efectividad de la terapia génica o de los esfuerzos de vacunación. Por consiguiente, los serotipos de adenovirus alternativos constituyen objetivos muy importantes en la búsqueda de los sistemas de suministro genético capaces de evadir la respuesta inmunitaria del huésped.

- 50 Un área de estos serotipos alternativos es la aquéllos derivados de primates no humanos, en especial adenovirus de

chimpancé. Véase la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,083,716, la cual describe el genoma de dos adenovirus de chimpancé.

Se ha mostrado que los vectores adenovirales del chimpancé ("Pan" o "C") inducen fuertes respuestas inmunes a los productos transgénicos tan eficientemente como los vectores adenovirales humanos (Fitzgerald et al., J. Immunol. 170:1416).

Los adenovirus de primates que no son humanos se pueden aislar a partir de los nodos linfáticos mesentéricos de los chimpancés. Los adenovirus del chimpancé son suficientemente similares al adenovirus humano subtipo C, para permitir la réplica del virus con supresión de E1 en las células HEK 293. No obstante, los adenovirus de chimpancé son filogenéticamente distintos de los serotipos humanos más comunes (Ad2 y Ad5). Pan6 está menos estrechamente relacionado con, y es serológicamente distinto de, los Pans 5, 7, y 9.

Por consiguiente, uno o más de los vectores adenovirales se pueden derivar a partir de un adenovirus de primate no humano, por ejemplo un adenovirus de chimpancé, tal como uno seleccionado a partir de los serotipos Pan5, Pan6, Pan7 y Pan9.

Los vectores adenovirales también se pueden derivar de más de un serotipo de adenovirus, y cada serotipo puede ser a partir de la misma o de diferente fuente. Por ejemplo, se pueden derivar a partir de más de un serotipo humano y/o de más de un serotipo de primate no humano. Los procedimientos para construir vectores adenovirales quiméricos se dan a conocer en el documento WO2005/001103.

Existen ciertas restricciones de tamaño asociadas con la inserción de ADN heterólogo en los adenovirus. Los adenovirus humanos tienen la capacidad para empaquetar hasta 105 por ciento de la longitud del genoma de tipo silvestre (Bett et al., 1993, J Virol 67 (10), 5911-21). Se ha demostrado que el límite de empaque inferior para los adenovirus humanos es el 75 por ciento de la longitud del genoma de tipo silvestre (Parks et al., 1995, J Virol 71(4), 3293-8).

Un ejemplo de adenovirus útiles en el presente documento invención es el de los adenovirus que son distintos de los serotipos prevalentes que se presentan naturalmente en la población humana, tales como Ad2 y Ad5. Esto evita la inducción de potentes respuestas inmunes contra el vector, lo cual limita la eficacia de las siguientes administraciones del mismo serotipo mediante el bloqueo de la absorción por el vector a través de la neutralización del anticuerpo y teniendo influencia sobre la toxicidad.

Por consiguiente, el adenovirus puede ser un adenovirus que no sea un serotipo de virus humano prevalente que se presente naturalmente. Los adenovirus aislados a partir de animales tienen componentes de capsida, hexon, penton, y fibra inmunológicamente distintos, pero están filogenéticamente relacionados estrechamente. De una manera específica, 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, ó 9. Los ejemplos de estas cepas se describen en la Publicación Internacional Número WO 03/000283, y están disponibles en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, y en 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].

Se piensa que el uso de adenovirus de chimpancé es conveniente sobre el uso de los serotipos de adenovirus humano, debido a la falta de inmunidad previamente existente, en particular la falta de anticuerpos de neutralización cruzada, para los adenovirus de la población objetivo. La reacción cruzada de los adenovirus de chimpancé con las respuestas de anticuerpo neutralizantes previamente existentes solamente está presente en el 2 por ciento de la población objetivo, comparándose con el 35 por ciento en el caso de ciertos vectores de adenovirus humano candidatos. Los adenovirus de chimpancé son distintos de los subtipos humanos más comunes Ad2 y Ad5, pero están más estrechamente relacionados con el Ad4 humano del subgrupo E, que no es un subtipo prevalente. Pan6 está menos estrechamente relacionado con Pan5, 7, y 9.

Los adenovirus de la invención pueden ser defectuosos en cuanto a la replicación. Esto significa que tienen una capacidad reducida para replicarse en las células que no sean de complemento, comparándose con el virus de tipo silvestre. Esto se puede provocar mediante la mutación del virus, por ejemplo, mediante la supresión de un gen involucrado en la réplica, por ejemplo la supresión del gen E1a, E1b, E3 o E4.

Los vectores adenovirales de conformidad con la presente invención se pueden derivar a partir de adenovirus defectuosos en réplica que comprendan una supresión funcional E1. Por consiguiente, los vectores adenovirales de acuerdo con la invención pueden ser defectuosos en réplica debido a la ausencia de la capacidad para expresar E1a y E1b adenovirales, es decir, están funcionalmente suprimidos en E1a y E1b. Los adenovirus recombinantes también pueden llevar supresiones funcionales en otros genes [véase la Publicación Internacional Número WO 03/000283], por ejemplo, supresiones en los genes E3 ó E4 (o en parte de los mismos, tal como en parte de E3). El gen temprano demorado de adenovirus E3 se puede eliminar de la secuencia de adenovirus que forma parte del virus recombinante.

5 La función de E3 no es necesaria para la producción de la partícula de adenovirus recombinante. Por consiguiente, no es necesario reemplazar la función de este producto genético con el objeto de empacar un adenovirus recombinante útil en la invención. En una forma de realización particular, los adenovirus recombinantes tienen los genes E1 y E3 funcionalmente suprimidos. La construcción de estos vectores se describe en Roy et al., Human Gene Therapy 15:519-530, 2004. En un aspecto, el adenovirus tiene E1 y E4 suprimidos, y parte de E3 suprimida.

10 Los adenovirus recombinantes también se pueden construir con una supresión funcional del gen E4, aunque puede ser deseable retener la función del ORF6 de E4. Los vectores de adenovirus de conformidad con la invención también pueden contener una supresión en el gen temprano demorado E2a. También se pueden hacer supresiones en cualquiera de los genes tardíos L1 a L5 del genoma del adenovirus. De una manera similar, pueden ser útiles las supresiones en los genes intermedios IX y IVa.

15 Se pueden hacer otras supresiones en los otros genes de adenovirus estructurales o no estructurales. Las supresiones anteriores se pueden utilizar individualmente, es decir, una secuencia de adenovirus para su uso en el presente documento invención puede contener supresiones de E1 solamente. De una manera alternativa, se pueden utilizar supresiones de los genes enteros o porciones de los mismos efectivas para destruir su actividad biológica en cualquier combinación. Por ejemplo, en un vector de ejemplo, las secuencias de adenovirus pueden tener supresiones de los genes C1 y del gen E4, o de los genes E1, E2, y E3, o de los genes E1 y E3 (tales como las supresiones funcionales en E1a y E1b, y una supresión de cuando menos parte de E3), o de los genes E1, E2a, y E4, con o sin supresión de E3, y así sucesivamente. Estas supresiones pueden ser supresiones parciales o completas de estos genes, y se pueden utilizar en combinación con otras mutaciones, tales como las mutaciones sensibles a la temperatura, para lograr un resultado deseado.

25 Los vectores adenovirales se pueden producir sobre cualquier línea celular adecuada en donde el virus sea capaz de replicarse. En particular, se pueden utilizar líneas celulares de complemento que proporcionen los factores que falten del vector viral que den como resultado sus características de réplica deterioradas (tal como E1 y/o E4). Sin limitación, esta línea celular puede ser de células HeLa [ATCC, Número de Acceso CCL 2], A549 [ATCC, Número de Acceso 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 todas disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209. Se pueden obtener otras líneas celulares progenitoras adecuadas en otras fuentes, tales como las células PER.C6©, como están representadas por las células depositadas bajo el ECACC Número 96022940 en la European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), en el Centre for Applied Microbiology and Research (CAMR, Reino Unido), o las células Her 96 (Crucell).

30 También se describe el uso de líneas celulares conocidas para la preparación de un vector viral que codifique una proteína de la presente invención.

Las secuencias de polinucleótidos que codifican los polipéptidos CS inmunogénicos pueden optimizarse en los codones para las células de mamífero. Esta optimización de codones se describe con detalle en el documento WO 05/025614.

35 En el presente documento se describen vacunas que comprenden una cantidad inmunoprotectora de partículas de proteína de conformidad con la invención, mezcladas con un diluyente o vehículo adecuado.

La invención también se extiende a una composición que comprende una partícula de acuerdo con la invención, y un vector viral que comprende un antígeno de paludismo, en particular un antígeno de paludismo común con esta partícula, y opcionalmente un adyuvante.

40 En el contexto de la presente memoria descriptiva, excipiente se refiere a un componente en una formulación farmacéutica sin efecto terapéutico alguno por su propio derecho. Un diluyente o vehículo cae dentro de la definición de un excipiente.

45 Con inmunogénico, en el contexto de la presente memoria descriptiva, se pretende hacer referencia a la capacidad para provocar una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, esta respuesta puede ser cuando la partícula de lipoproteína se administra en una formulación apropiada, que puede incluir/requerir un adyuvante adecuado. Se puede requerir un refuerzo que comprenda una dosis similar o menor a la dosis original, para obtener la respuesta inmunogénica requerida.

50 La composición/formulaciones farmacéuticas también puede incluir, en mezcla, uno o más antígenos adicionales, tales como aquéllos derivados de *P. falciparum* y/o *P. vivax*, por ejemplo, en donde el antígeno se selecciona a partir de DBP, PvTRAP, PvMSP2, PvMSP4, PvMSP5, PvMSP6, PvMSP7, PvMSP8, PvMSP9, PvAMA1 y RBP, o un fragmento de los mismos.

Otro ejemplo de 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* antígenos incluyen EBA de *P. falciparum*, GLURP, RAP1, RAP2,

Secuestrina, Pf332, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs48/45, Pfs230 y sus análogos en otros *Plasmodium* spp.

Las composiciones/formulaciones farmacéuticas de acuerdo con la invención también pueden comprender partículas de RTS, S (como se describen en el documento WO 93/10152), mezcladas con las partículas de conformidad con la invención.

En una forma de realización, la construcción del vector viral es como se describe en el documento WO 2004/055187.

En la vacuna de la invención, se puede utilizar directamente una solución acuosa de la partícula. De una manera alternativa, la proteína con o sin previa liofilización, se puede mezclar o absorber con cualquiera de los adyuvantes conocidos, los cuales incluyen, pero no se limitan a, alum dipéptido de muramilo, saponinas tales como Quil A.

Los adyuvantes particulares son aquéllos seleccionados a partir del grupo de sales de metales, emulsiones de aceite en agua, agonistas de receptores tipo Toll (en particular el agonista del receptor tipo Toll 2, el agonista del receptor tipo Toll 3, el agonista del receptor tipo Toll 4, el agonista del receptor tipo Toll 7, el agonista del receptor tipo Toll 8, y el agonista del receptor tipo Toll 9), saponinas, o combinaciones de los mismos, con la condición de que las sales de metales se utilicen solamente en combinación con otro adyuvante y no solas, a menos que se fomulen de tal manera que no más de aproximadamente el 60 por ciento del antígeno sea adsorbido sobre la sal de metal. De una manera más específica, no más de aproximadamente el 50 por ciento, por ejemplo del 40 por ciento del antígeno es adsorbido sobre la sal de metal, y en una forma de realización, no más de aproximadamente el 30 por ciento del antígeno es adsorbido sobre la sal de metal. El nivel de anticuerpo adsorbido sobre la sal de metal se puede determinar mediante técnicas bien conocidas en este campo. El nivel de antígeno libre se puede incrementar, por ejemplo, mediante la formulación de la composición en la presencia de iones de fosfato, tales como suero regulado con fosfato, o mediante el aumento de la proporción del antígeno a la sal de metal. En una forma de realización, el adyuvante no incluye una sal de metal como el único adyuvante. En una forma de realización, el adyuvante no incluye una sal de metal.

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

El monofosforil-lípido A 3-desacilado se conoce de la Patente de EE.UU. Número 4,912,094, y de la Solicitud de Patente del Reino Unido Número 2.220.211 (Ribi), y está disponible en Ribi Immunochem, Montana, EE.UU.

El 3D-MPL se vende bajo la marca comercial registrada MPL® por Corixa Corporation, y promueve primordialmente las respuestas de células T CD4+ con un fenotipo de IFN-g (Th1). Se puede producir de acuerdo con los procedimientos que se dan a conocer en la Patente Británica Número GB 2,220,211 A. Químicamente, es una mezcla de fosforil-lípido A 3-desacilado con 3, 4, 5 o 6 cadenas aciladas. De preferencia, en las composiciones de la presente invención, se utiliza 3D-MPL de partículas pequeñas. El 3D-MPL de partículas pequeñas tiene un tamaño de partículas tal que se puede filtrar para esterilizar a través de un filtro de 0,22 µm. Estas preparaciones se describen en la Solicitud de Patente Internacional Número WO 94/21292. Los derivados sintéticos del lípido A son conocidos, y se piensa que son agonistas del TLR 4, incluyendo, entre otros:

OM 174 (dihidrogen-fosfato de 2-desoxi-6-O-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxi-tetra-decanoil-amino]-4-o-fosfono-β-D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxi-tetradecanoil-amino]-α-D-glucopiranosilo), (documento WO 95/14026).

OM 294 DP (1,10-bis-(dihidrogen-fosfato) de (3S,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxi-tetradecanoil-amino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxi-tetradecanoil-amino]-decano-1,10-diol) (documentos WO99/64301 y WO 00/0462).

OM 197 MP-Ac DP 10-(6-amino-hexanoato) de 1-dihidrogen-fosfato de (3S-,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxi-tetradecanoil-amino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxi-tetradecanoil-amino]-decano-1,10-diol) (documento WO 01/46127).

Típicamente, cuando se utiliza 3D-MPL, el antígeno y el 3D-MPL se suministran con alum, o se presentan en una emulsión de aceite en agua, o en múltiples emulsiones de aceite en agua. La incorporación de 3D-MPL es conveniente, debido a que es un estimulante de las respuestas de las células-T efectoras.

Otros ligandos de TLR4 que se pueden utilizar son los fosfatos de alquil-glucosaminida (AGP), tales como aquéllos que se dan a conocer en los documentos WO 9850399 o US 6303347 (también se dan a conocer los procesos para la preparación de AGP), o las sales farmacéuticamente aceptables de las AGPs, como se dan a conocer en el documento US 6764840. Algunas AGP son agonistas de TLR4, y algunas son antagonistas de TLR4. Se piensa que ambas son útiles como adyuvantes.

Otro inmunoestimulante para su uso en el presente documento invención es Quil A y sus derivados. Quil A es una

preparación de saponina aislada a partir del árbol sudamericano Quillaja Saponaria Molina, y fue descrita por primera vez por tener una actividad adyuvante por Dalsgaard et al. en 1974 ("Saponin adjuvants", Archiv. für die gesamte Virusforschung, Volumen 44, Springer Verlag, Berlín, páginas 243-254). Se han aislado fragmentos purificados de Quil A mediante HPLC, que retienen la actividad adyuvante sin la toxicidad asociada con Quil A (Patente Europea Número EP 0,362,278), por ejemplo QS7 y QS21 (también conocidos como QA7 y QA21). QS21 es una saponina natural derivada a partir de la corteza de Quillaja Saponaria Molina, que induce a las células T citotóxicas CD8+ (CTLs), a las células Th1, y una respuesta de anticuerpo IgG2a predominante.

Se han descrito formulaciones particulares de QS21 que comprenden además un esteroil (documento WO 96/33739). La proporción de QS21:esteroil típicamente será del orden de 1:100 a 1:1 en peso por peso. En términos generales, está presente un exceso de esteroil, siendo la proporción de QS21:esteroil de cuando menos 1:2 en peso /peso. Típicamente, para administración a seres humanos, QS21 y el esteroil estarán presentes en una vacuna en el intervalo de aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 100 µg, tal como de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 50 µg por dosis.

Los liposomas contienen en general un lípido neutro, por ejemplo fosfatidil-colina, que normalmente no es cristalina a temperatura ambiente, por ejemplo fosfatidil-colina de yema de huevo, dioleoil-fosfatidil-colina, o dilauril-fosfatidil-colina. Los liposomas también pueden contener un lípido cargado que aumente la estabilidad de la estructura del liposoma QS21 para los liposomas compuestos de lípidos saturados. En estos casos, la cantidad de lípido cargado es con frecuencia del 1 al 20 por ciento en peso/peso, tal como del 5 al 10 %. La proporción del esteroil al fosfolípido es del 1 al 50 % (molar/molar), tal como del 20 al 25 %.

Estas composiciones pueden contener MPL (monofosforil-lípido A 3-desacilado, también conocido como 3D-MPL). El 3D-MPL se conoce de la Patente Británica Número GB 2,220,211 (Ribi), como una mezcla de tres tipos de monofosforil-lípido A des-O-acilado con 4, 5, ó 6 cadenas aciladas, y es fabricado por Ribi Immunotech, Montana.

Las saponinas pueden estar separadas en la forma de micelios, micelios mixtos (en general, pero en exclusivamente con las sales biliares), o pueden estar en la forma de matrices ISCOM (Patente Europea Número EP 0,109,942), liposomas, o estructuras coloidales relacionadas, tales como complejos multiméricos tipo gusano o tipo anillo, o estructuras lipídicas/en capas y láminas cuando se formulan con colesterol y lípido, o en la forma de una emulsión de aceite en agua (por ejemplo, como en el documento WO 95/17210). Las saponinas pueden estar asociadas con frecuencia con una sal metálica, tal como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio (documento WO 98/15287).

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

También se pueden utilizar oligonucleótidos inmunoestimulantes. Ejemplos de los oligonucleótidos para su uso en los adyuvantes o vacunas de la presente invención incluyen los oligonucleótidos que contienen CpG, que contienen en general dos o más motivos CpG de dinucleótidos separados por cuando menos tres, más preferiblemente cuando menos seis o más nucleótidos. Un motivo CpG es un nucleótido de citosina seguido por un nucleótido de guanina. Los oligonucleótidos CpG son típicamente desoxinucleótidos. En una forma de realización, el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato, o más preferiblemente un enlace de fosfortioato, aunque los enlaces de fosfodiéster y otros enlaces internucleótidos están dentro del alcance de la invención. Dentro del alcance de la invención también se incluyen los oligonucleótidos con enlaces internucleótidos mixtos. Los procedimientos para la producción de oligonucleótidos de fosfortioato o fosforoditioato se describen en los documentos US 5,666,153 y US 5,278,302, y en el documento WO 95/26204.

Ejemplos de los oligonucleótidos son los siguientes:

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),

y las secuencias pueden contener enlaces internucleótidos modificados por fosfortioato.

Oligonucleótidos CpG alternativos pueden comprender una o más secuencias de las anteriores, teniendo supresiones o adiciones en consecuencia a las mismas.

Oligonucleótidos CpG se pueden sintetizar mediante cualquier procedimiento conocido en la materia (por ejemplo, véase la Patente Europea Número EP 468520). De una manera conveniente, estos oligonucleótidos se pueden sintetizar utilizando un sintetizador automatizado.

5 Ejemplos de un agonista de TLR 2 incluyen peptidoglicano o lipoproteína. Las imidazoquinolinas, tales como Imiquimod y Resiquimod son agonistas de TLR7 conocidos. El ARN de una sola cadena también es un agonista de TLR conocido (TLR8 en seres humanos, y TLR7 en ratones), mientras que el ARN de doble cadena y el poli-IC (ácido poliinosínico-policitídilico - un mimético sintético comercial del ARN viral) 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.

10 De una manera alternativa o en adición, se puede incluir un inmunoestimulante. En una forma de realización, este inmunoestimulante será el monofosforil-lípido A 3-desacilado (3D-MPL).

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

En un aspecto, el adyuvante comprende QS21.

En un aspecto, el adyuvante comprende CpG.

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

15 En un aspecto, el adyuvante se formula como liposomas.

Las combinaciones de adyuvantes incluyen 3D-MPL y QS21 (Patente Europea Número EP 0 671 948 B1), emulsiones de aceite en agua que comprenden 3D-MPL y QS21 (Publicaciones Internacionales Números WO 95/17210 y WO 98/56414), o 3D-MPL formulado con otros vehículos (Patente Europea Número EP 0 689 454 B1). Otros sistemas adyuvantes preferidos comprenden una combinación de 3D-MPL, QS21 y oligonucleótidos CpG, como se describen en los documentos US 6558670 y US 6544518.

20 En un caso se proporciona una vacuna que comprende las partículas descritas en el presente documento, en combinación con 3D-MPL y un vehículo. Típicamente, el vehículo será una emulsión de aceite en agua, o alúmina.

Las partículas de proteína de la presente invención también se pueden encapsular en micropartículas, tales como liposomas.

25 La preparación de la vacuna se describe en general en New Trends and Developments in Vaccines, editado por Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, EE.UU., 1978. La encapsulación dentro de liposomas es descrita, por ejemplo, por Fullerton, la patente de EE.UU. 4.235.877.

La cantidad de las partículas de proteína de la presente invención, presentes en cada dosis de vacuna, se selecciona como una cantidad que induzca una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en las vacunas típicas. Esta cantidad variará dependiendo de cuál inmunógeno específico se esté empleando, y si la vacuna tiene o no adyuvante. En términos generales, se espera que cada dosis comprenderá de 1 a 1.000 µg de proteína, de preferencia de 1 a 200 µg, más preferiblemente de 10 a 100 µg. Se puede aseverar una cantidad óptima para una vacuna particular mediante estudios convencionales que involucren la observación de titulaciones de anticuerpos y otras respuestas en los sujetos. En seguida de una vacunación inicial, los sujetos de preferencia recibirán un refuerzo en aproximadamente cuatro semanas, seguido por refuerzos repetidos cada seis meses, durante tanto como exista un riesgo de infección. La respuesta inmunitaria a la proteína de esta invención se mejora mediante el uso del adyuvante y/o un inmunoestimulante.

30 La cantidad de 3D MPL utilizada es en general pequeña, pero, dependiendo de la formulación de la vacuna, puede estar en la región de 1 a 1.000 µg por dosis, por ejemplo de 1 a 500 µg por dosis, y tal como entre 1 y 100 µg por dosis.

40 La cantidad de CpG o de oligonucleótidos inmunoestimulantes en los adyuvantes o en las vacunas de la presente invención es en general pequeña, pero, dependiendo de la formulación de la vacuna, puede estar en la región de 1 a 1.000 µg por dosis, de preferencia de 1 a 500 µg por dosis, y más preferiblemente entre 1 y 100 µg por dosis.

La cantidad de saponina para su uso en los adyuvantes de la presente invención puede estar en la región de 1 a 1.000 µg por dosis, de preferencia de 1 a 500 µg por dosis, más preferiblemente de 1 a 250 µgs por dosis, y de una manera muy preferible entre 1 y 100 µg por dosis.

45 Las formulaciones de la presente invención se pueden utilizar para propósitos tanto profilácticos como terapéuticos. La terapia incluye el tratamiento profiláctico. De conformidad con lo anterior, la invención proporciona una composición de vacuna, como se describe en el presente documento, para su uso en medicina, por ejemplo, para el tratamiento

(incluyendo la profilaxis) de paludismo.

Un aspecto adicional de la presente invención es proporcionar un proceso para la preparación de la proteína híbrida de la invención, cuyo proceso comprende expresar la secuencia de ADN que codifica la proteína, en un huésped adecuado, de preferencia una levadura, y recuperar el producto.

5 En el presente documento se describe un procedimiento para el tratamiento de un paciente susceptible a las infecciones por *Plasmodium*, mediante la administración de una cantidad efectiva de una vacuna como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

10 En el presente documento se describe una combinación para tratamiento, la cual comprende: una partícula inmunogénica de acuerdo con la invención, y un vector viral que codifique para un antígeno de paludismo, tal como dicho antígeno híbrido.

Por ejemplo, cuando dicha partícula y dicho vector viral se administran de forma concomitante, por ejemplo, se pueden mezclar para su administración simultánea, o de una manera alternativa, se pueden formular para su administración en secuencia.

15 Como se utiliza en el presente documento, el término "de forma concomitante" significa cuando esta 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 cita con el profesional de la salud, por ejemplo, cuando se administran en secuencia o de una manera simultánea.

También se describen regímenes de refuerzo de la preparación con los diferentes componentes descritos en el presente documento, por ejemplo la preparación con el vector viral, y el refuerzo con las partículas mencionadas, o viceversa.

20 En el contexto de esta memoria descriptiva, que comprende debe interpretarse como que incluye.

Los siguientes ejemplos se muestran para ilustrar la metodología, que se puede emplear para preparar las partículas de la invención. Los ejemplos pueden o no formar un aspecto de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

25 Descripción de la Cepa Y1834

Se puede utilizar la cepa recombinante de levadura Y1834 para expresar la proteína de fusión. Ésta consiste en la cepa huésped DC5 de *Saccharomyces cerevisiae* transformada con el vector de expresión recombinante pRIT15546.

30 DC5 es una cepa de levadura de laboratorio (ATCC N° 20820) con el siguiente genotipo: leu2-3, leu2-112, his3, can1-11. La doble mutación de leu-2 permite hacer la selección para la absorción y el mantenimiento del vector pRIT15546, que lleva una copia funcional del gen LEU2. Solamente las células que lleven un vector con un gen LEU2 pueden crecer cuando está ausente la leucina del medio de crecimiento.

El vector pRIT15546 es un vector de expresión episomal de levadura (vector basado en 2 μ) que lleva el casete de expresión. La expresión recombinante es impulsada por un promotor derivado del gen de levadura TDH3 (expresión constitutiva). La construcción del vector pRIT15546 se detalla más adelante.

35 Construcción del vector pRIT15546.

40 Se construye un gen sintético, con un uso de codones apropiado para la expresión en levadura, y se sub-clona en el vector pUC57. El plásmido resultante pUC57/CSV, y el vector de expresión de levadura pGf1-S2, se restringen ambos con la enzima apropiada. El vector pGf1-S2 se construyó (en GSK) mediante un procedimiento de clonación de múltiples pasos. Este vector, que ya lleva un casete de expresión de S, permite hacer la construcción de genes de fusión, como la fusión N-terminal dentro del marco con el gen S del virus de hepatitis B. El vector de expresión final, después de la verificación de la secuencia, se nombró como pRIT15546 (Figura 3).

Transformación de la cepa DC5.

45 La cepa DC5 leu y his-auxotrófica se transforma con el plásmido recombinante pRIT15546, utilizando el protocolo estándar de levadura. Las células transformadas se aplicaron sobre placas selectivas de ágar. Se seleccionó un transformante, y recibió la designación oficial de Y1834.

Expresión de la proteína recombinante:

Y1834 se cultiva a 30°C, en medio mínimo **YNB** (Base de Nitrógeno de Levadura disponible en Kracker Scientific Inc.) complementado con 8 µg/ml de histidina hasta una D.O.. (620 nanómetros) de 0,5. Estas células se cosechan y se preparan los extractos celulares.

Preparación del Extracto:

- 5 Las células se vuelven a suspender en tampón de degradación y se alteran mecánicamente (perlas de vidrio). El extracto se centrifuga durante 15 minutos a 5.000 revoluciones por minuto. La fracción del sobrenadante se ejecuta sobre del 4 al 20 % de SDS-PAGE.

Tampón de degradación: Tampón fosfato-Na 50 mM (pH de 7,5)

EDTA 4 mM.

- 10 Tween 20 al 0,05 %.

+ Cóctel inhibidor de proteasas (Complete/ROCHE).

Concentración Celular: 100 mililitros de cultivo (DO: 0,5) en 5 mililitros de tampón de degradación = concentración de 10 unidades DO/ml.

Aclaración del extracto crudo: extracto centrifugado durante 15 minutos/5.000 rpm.

- 15 **Detección de la Proteína Recombinante**

Los extractos aclarados se ejecutan sobre el 4-20 por ciento de SDS-PAGE, se transfieren las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, y se someten a inmunotinción.

Análisis de transferencia de tipo Western:

Reactivo = anticuerpo monoclonal de ratón anti-S (preparado por GSK Biologicals) - (dilución: 1/500).

- 20 Los anticuerpos anti-S que están comercialmente disponibles, pueden utilizarse para sustituir a los empleados en este procedimiento. De una manera alternativa, se pueden emplear anticuerpos anti-CSV, por ejemplo, aquéllos conocidos como MR4, disponibles en el NIH.

Ejemplo 2:

Descripción de la Cepa Y1835

- 25 La cepa recombinante de levadura Y1835 expresa simultáneamente la proteína de fusión CSV-S y el antígeno S. Para obtener una cepa que co-exprese las proteínas CSV-S y S, la cepa Y1295 de *Saccharomyces cerevisiae*, que ya lleva cinco copias integradas de casetes de expresión de S, se transformó con el vector de expresión integrativo recombinante pRIT15582.

- 30 La cepa Y1295 se construyó en GSK mediante un procedimiento de transformación de múltiples pasos. La construcción de la cepa Y1295 se describe en la Publicación Internacional Número WO93/10152. La cepa Y1295 tiene el siguiente genotipo: leu2-3, leu2-112, gal1. La mutación leu-2 permite hacer la selección para la absorción del fragmento de ADN lineal derivado de pRIT15582, que lleva el casete CSV-S y el gen funcional LEU2.

- 35 El vector pRIT15582 es un vector de expresión integrativo de levadura (vector basado en Ty) que lleva el casete de expresión CSV-S. La expresión recombinante es expresada por un promotor derivado del gen de levadura TDH3 (expresión constitutiva). A continuación se detalla la construcción del vector pRIT15582.

Construcción del vector integrativo pRIT15582.

- 40 El material de partida utilizado para construir el vector pRIT15582 fue el plásmido de expresión pRIT15546 (Figura 1). La construcción de este plásmido se describe en el Ejemplo 1. La digestión del pRIT15546 con la endonucleasa HindIII libera un fragmento de ADN de 3,706 pares de bases de largo que corresponde al casete de expresión completo CSV-S (pTDH3 + CSV-S + tARG3). Este fragmento de ADN de HindIII (después de rellenarse con la polimerasa de ADN T4) se insertó sobre el vector integrativo basado en Ty pRIT13144 en el sitio de clonación único Sall (restringido con Sall/tratado con T4). El plásmido resultante pRIT15582 contiene, en adición al casete de expresión, el gen de levadura LEU2 como el marcador selectivo (Figura 3). La digestión del pRIT15582 con la endonucleasa XhoI libera un fragmento lineal de 8,500 pares de bases mostrado en la Figura 4, el cual se puede integrar en el genoma de levadura mediante recombinación homóloga de los extremos libres con los elementos Ty residentes.
- 45

Transformación de la cepa Y1295.

5 Para obtener una cepa que exprese ambas proteínas S y CSV-S, la cepa Y1295 se transformó con el fragmento lineal de XhoI de 8,500 pares de bases (Figura 4), con selección para las colonias de Leu+. Se obtuvieron varios integrantes que contenían conjuntos de ambos casetes de expresión presentes en el genoma en diferentes proporciones. Se seleccionó un transformante que llevaba cuatro copias de casetes CSV-S, y se le dio la designación oficial de Y1835.

Expresión de la Proteína Recombinante:

Y1835 se cultiva a 30°C en medio mínimo **YNB** (Base de Nitrógeno de Levadura disponible en Kracker Scientific Inc.), a una D.O. (620 nanómetros) de aproximadamente 0,5 (0,8). Después se cosechan las células, y se preparan los extractos celulares.

10 **Análisis de los Productos de Expresión Mediante Inmunotransferencia:**

Preparación del Extracto:

Las células se vuelven a suspender en tampón de degradación, y se alteran mecánicamente (perlas de vidrio). El extracto se centrifuga durante 5 a 10 minutos a 5,000 revoluciones por minuto. La fracción del sobrenadante se ejecuta sobre el 12,5 % de SDS-PAGE.

15 Tampón de degradación: Tampón de fosfato-Na 50 mM (pH de 7,5)

EDTA 4 mM.

Tween 20 al 0,5 %.

+ cóctel inhibidor de proteasas (Complete/ROCHE).

20 Concentración celular: 100 mililitros de cultivo (DO:0,5) en 2,5 ml de tampón de degradación = concentración de 20 unidades de DO/ml.

Aclaración del extracto crudo: extracto centrifugado durante 5 a 10 minutos/5.000 rpm.

Detección de la Proteína Recombinante

Los extractos aclarados se ejecutan sobre el 12,5 % de SDS-PAGE, se transfieren las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, y se someten a inmunotinción.

25 Análisis de transferencia de tipo Western (Figura 5):

Reactivos: 1/anticuerpo monoclonal de ratón anti-S (preparado por GSK Biologicals)-(dilución:1/250).

2/anticuerpo policlonal de conejo anti-CSV (amablemente proporcionado por WRAIR)-dilución de 1/20.000.

30 Los anticuerpos anti-S, así como los anticuerpos anti-*P. vivax*/CSP, los cuales están comercialmente disponibles, se pueden utilizar para sustituir a aquéllos empleados en este procedimiento.

Ejemplo 3:

Descripción de la cepa Y1845

35 La cepa recombinante de levadura Y1845 expresa simultáneamente la proteína de fusión CSV-S, la fusión RTS, y el antígeno S. Para obtener una cepa que co-exprese CSV-S, RTS, y la proteína S, la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Y1295, que ya lleva cinco copias integradas de los casetes de expresión de S, se transformó con una solución equimolar de fragmentos de ADN lineales de RTS y CSV-S derivados de los vectores integrativos pRIT13540 y pRIT15582, respectivamente.

40 La cepa Y1295 se construyó en GSK mediante un procedimiento de transformación de múltiples pasos. La construcción de la cepa Y1295 se describe en la Publicación Internacional Número WO93/10152. La cepa Y1295 tiene el siguiente genotipo: leu2-3, leu2-112, gal1. La mutación de leu-2 permite hacer la selección para la absorción del fragmento de ADN lineal derivado de pRIT15582, que lleva el casete de CSV-S, y el gen funcional LEU2.

Los vectores pRIT13540 y pRIT15582 son vectores de expresión integrativos de levadura (vector basado en Ty) que

llevan los casetes de expresión RTS CSV-S, respectivamente. Para ambos vectores, la expresión recombinante es impulsada por un promotor derivado del gen de levadura TDH3 (expresión constitutiva). La construcción del vector pRIT15582 se detalla en el Ejemplo 2. La construcción del vector pRIT13540 se describe en el documento WO93/10152.

Preparación de los Fragmentos de ADN integrativos lineales.

- 5 Los vectores integrativos pRIT13540 y pRIT15582 se restringieron ambos con la endonucleasa *Xho*I, liberando un fragmento de ADN de 8.200 pares de bases y un fragmento de ADN de 8.500 pares de bases, respectivamente. Estos fragmentos se pueden integrar en el genoma de levadura mediante recombinación homóloga de los extremos libres con los elementos Ty residentes.

Transformación de la cepa Y1295.

- 10 Para obtener una cepa que exprese las tres proteínas RTS, CSV-S, y S, la cepa Y1295 se transformó con una solución equimolar de los fragmentos lineales *Xho*I de 8.200 pares de bases y de 8.500 pares de bases, con selección para las colonias de Leu+. Se obtuvieron varios integrantes que contenían conjuntos de los dos casetes de expresión presentes en el genoma en diferentes proporciones. Se seleccionó un transformante que llevaba cuatro copias de CSV-S, y dos copias de RTS (en adición a las cinco copias de los casetes S), y se le dio la designación oficial de Y1845.

15 **Expresión de la proteína recombinante:**

Y1845 se cultiva a 30°C en medio mínimo **YNB** (Base de Nitrógeno de Levadura disponible en Kracker Scientific Inc.) a una DO (620 nanómetros) de 0,5. Después se cosechan las células y se preparan los extractos celulares.

Análisis de los productos de expresión mediante inmunotransferencia:

Preparación del Extracto:

- 20 Las células se vuelven a suspender en el Tampón de degradación, y se alteran mecánicamente (perlas de vidrio). El extracto se centrifuga durante 5 a 10 minutos a 5.000 rpm. La fracción del sobrenadante se ejecuta en 12,5 % de SDS-PAGE.

Tampón de degradación: Tampón fosfato-Na 50 mM (pH de 7,5).

EDTA 4 mM.

- 25 Tween 20 al 0,5 %.

+ Cóctel inhibidor de proteasas (Complete/ROCHE).

Concentración celular: 100 ml de cultivo (DO:0,5) en 5 ml de tampón de degradación = concentración de 10 unidades DO/ml.

Aclaración del extracto crudo: extracto centrifugado durante 5 a 10 minutos a 5.000 rpm.

30 Detección de la proteína recombinante

Los extractos aclarados se ejecutan en SDS-PAGE al 12,5 %, las proteínas se transfieren a la membrana de nitrocelulosa, y se someten a inmunotinción:

Análisis de transferencia de tipo Western

Reactivo: Anticuerpo monoclonal de ratón anti-S (preparado por GSK Biologicals)-(dilución:1/500).

35 **Centrifugación en gradiente de densidad de CsCl**

Se analizó la formación de partículas en la cepa Y1845 mediante la centrifugación en gradiente de densidad de CsCl. Los extractos crudos (aproximadamente 20 miligramos de proteína total) se analizaron sobre un gradiente de 12 mililitros de CsCl 1.5M (88 horas a 40,000 revoluciones por minuto, +8°C, en un rotor Beckman 70.1 Ti). Las fracciones (aproximadamente 0.6 mililitros) se recolectaron y se analizaron mediante inmunotransferencia, utilizando un anticuerpo anti-S. Como se muestra en la Figura 8, los picos de las transferencias de tipo Western aparecen en las mismas fracciones (Números 10 y 11) del gradiente que corresponde a una densidad boyante de 1.21 y 1.20 gramos/centímetro cúbico. La triple formación de partículas es soportada por el análisis en gradiente.

40

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, Suplemento 2: 65-70, 1987.
- 5 (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. y 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 J. B, y Fink G. R, "Transformation of Yeast", Proc Natl. Acad Sci EUA 75: 1929-1933, 1980.
- 10 (5) Broach J. R, Strathern J. N, y Hicks J. B, "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 J. B, Williams J. L. Mc Cutchan T. F, et al., "Structure of the Gene Encoding the Immunodominant Surface Antigen on the Sporozoites of the Human Paludismo Parasite *Plasmodium falciparum*", Science 225: 593-599, 1984.
- 15 (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) En SS, Kee-Hoyung L, Young R. K, et al., "Comparison of Immunological Responses to Various Types of Circumsporozoite Proteins of *Plasmodium vivax* in Paludismo Patients of Korea", Microbiol. Immunol. 48(2): 119-123, 2004; Microbiol. Immunol. 2004; 48(2): 119-123.
- 20 (10) Rathore D, Sacci J. B, 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 Nº 1**
REGION 1
KLLQP
5
- SEC ID Nº 2**
REGION II PLUS
CSVTCG
- 10 **SEC ID Nº 3**
VK210 repeat
GDRAAGQPA
- 15 **SEC ID Nº 4**
VK210 repeat
GDRADGQPA
- 20 **SEC ID Nº 5**
VK210 repeat
GDRADGQAA
- 25 **SEC ID Nº 6**
VK210 repeat
GNGAGGQPA
- 30 **SEC ID Nº 7**
VK210 repeat
GDGAAGQPA
- 35 **SEC ID Nº 8**
VK210 repeat
GDRAA GQAA
- 40 **SEC ID Nº 9**
VK210 repeat
GNGAGGQAA
- 45 **SEC ID Nº 10**
Major VK247 repeat
ANGAGNQPG
- SEC ID Nº 11**
12 amino acid insert
GGNAANKKAEDA
- SEC ID Nº 12**
Pv-CS Secuencia de nucleótidos

AcacattgCGGacataatgtagatttatctaaagctataaatttaaattggtgtaaac
ttcaataacgtagacgctagttcactcggggctgCG

cacgtaggtcagtcctgctagcagggggcgCGgtctcggggaaaaccagacgacgaa
gaaggtgatgctaaaaagaaaaaggacg
gtaaaaaagCGgaaccaaaaaatccaagggaaaataaattaaacagcccggggatc
gcgCGgatggtcaagcggcgggtaatggg
gCGgggggtcaaccagcgggggatcgcgCGggtcagccagcgggggatcgcgCG
gctggtcagccagcgggggatggtgc
ggctggccaaccagcgggggatcgcgCGggtcagccagcgggggatcgcgCGga
tggtcaaccagccggtgatcgcgCGgct
ggccaagcggccggtaatggggcggggggtcaagcggccgcgaacggagcggggaac
cagccagcggcggtaacgctgcga
ataaaaaagCGgaagatgCGggtggtaacgCGggcggtaatgCGggcggccaaggtc
agaacaacgaaggggctaatagcacaaa
cgaaaaatctgtcaaagaatatctcgataaagtccgCGctacagtagggacagaatg
gacgcatgctctgtaacatgtggtgctCGgggt
acgCGtgCGccCGctgtcaatgCGgctaacaaaaaccagaagatctcaggttaa
tgatctcgaaacggatgtctgcaca

SEC ID Nº 13

Secuencia de aminoácidos de la proteína Pv-CS

THCGHNVDLSKAINLNGVNFNNVDASSLGAAHVGQSASRGRGLGEN
PDDEEGDAKKKKDGKKAEPKNPRENKLKQPGDRADGQAAGNGAGG
QPAGDRAAGQPAGDRAAGQPAGDGAAGQPAGDRADGQPAGDRADG
QPAGDRAAGQAAGNGAGGQAAANGAGNQPGGGNAANKKAEDAGG
NAGGNAGGQGQNNEGANAPNEKSVKEYLDKVRATVGTEWTPCSV
CGVGVRVRRRVNAANKKPEDLTLNDLETDVCT

5 **SEC ID Nº 14**

Repetición 2 de tipo menor
ANGAGDQPG

10 **SEC ID Nº 15**
GEN HÍBRIDO CSV

ACCCATTGTGGTCACAATGTCGATTTGTCTAAGGCCATTAACCTGAACGGTGTAAATTC 60
 AACACGTCGATGCTTCTTCTTTAGGTGCCGCTCATGTTGGTCAATCTGCTTCAAGAGGT 120
 AGAGGTTTAGGTGAAAACCCAGACGACGAAGAAGGTGACGCTAAGAAGAAGAAGGACGGT 180
 AAGAAGGCCGAACCAAAGAACCCAAGAGAAAACAAGTTGAAACAACCAGGTGACAGAGCC 240
 GACGGACAAGCAGCTGGTAATGGTGTCTGGAGGTCAACCAGCTGGTGACAGAGCTGCCGGT 300
 CAGCCTGTGGTGATAGAGCTGCTGGACAACCTGCTGGAGACGGTGCCGCCGGTCAACCT 360
 GCTGGTGATAGAGCAGACGGACAACCAGCTGGTGACCGTGCTGACGGACAGCCAGCCGGC 420
 GATAGGGCTGCAGGTCAAGCCGCTGGTAACGGTGCCGGTGGTCAAGCTGCTGCTAACGGT 480
 GCTGGTAACCAACCAGGTGGTGGTAACGCTGCCAACAAGAAAGCTGAAGACGCTGGTGGT 540
 AATGCTGGAGGTAATGCAGGTGGTCAGGGTCAAAAACAACGAAGGTGCTAACGCTCCAAAC 600
 GAAAAGTCTGTTAAGGAATACTTAGATAAGGTTAGAGCTACTGTCCGTACTGAATGGACT 660
 CCATGTTCTGTTACTTGTGGTGTCCGGTGTAGAGTTAGAAGAAGAGTTAACGCCGCTAAC 720
 AAGAAGCCAGAAGACTTGACTCTAAACGACTTGAAACTGACGTTTGTACT 771

SEC ID N° 16
 Fusión CSV-S fusion
 Secuencia de nucleótidos

ATGATGGCTCCCGGGACCCATTGTGGTCACAATGTCGATTTGTCTAAGGCCATTAACCTG 60
 AACGGTGTAAATTTCAACAACGTCGATGCTTCTTCTTTAGGTGCCGCTCATGTTGGTCAA 120
 TCTGCTTCAAGAGGTAGAGGTTTAGGTGAAAACCCAGACGACGAAGAAGGTGACGCTAAG 180
 AAGAAGAAGGACGGTAAGAAGGCCGAACCAAAGAACCCAAGAGAAAACAAGTTGAAACAA 240
 CCAGGTGACAGAGCCGACGGACAAGCAGCTGGTAATGGTGTCTGGAGGTCAACCAGCTGGT 300
 GACAGAGCTGCCGGT CAGCCTGTGGTGATAGAGCTGCTGGACAACCTGCTGGAGACGGT 360
 GCCGCCGGTCAACCTGCTGGTGATAGAGCAGACGGACAACCAGCTGGTGACCGTGCTGAC 420
 GGACAGCCAGCCGGCGATAGGGCTGCAGGTCAAGCCGCTGGTAACGGTGCCGGTGGTCAA 480
 GCTGCTGCTAACGGTGCTGGTAACCAACCAGGTGGTGGTAACGCTGCCAACAAGAAAGCT 540
 GAAGACGCTGGTGGTAATGCTGGAGGTAATGCAGGTGGT CAGGGTCAAAAACAACGAAGGT 600
 GCTAACGCTCCAAACGAAAAGTCTGTTAAGGAATACTTAGATAAGGTTAGAGCTACTGTC 660
 GGTAAGTGAATGGACTCCATGTTCTGTTACTTGTGGTGTCCGGTGTAGAGTTAGAAGAAGA 720
 GTTAACGCCGCTAACAAGAAGCCAGAAGACTTGACTCTAAACGACTTGAAACTGACGTT 780
 TGTACTCCCGGGCCTGTGACGAACATGGAGAACATCACATCAGGATTCTAGGACCCCTG 840
 CTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTTCTTGTGACAAGAATCCTCACAATACCGCAGAGTCTA 900
 GACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTAGGGGGATCACCCGTGTGTCTTGGCCAAAAT 960
 TCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTACCAACCTCCTGTCTCTCAATTTGTCTCTGGTTAT 1020
 CGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATATTCCTCTTCATCTGCTGCTATGCCTCATC 1080
 TTCTTATTGGTTCTTCTGGATTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTAATTCAGGA 1140
 TCAACAACAACCAATACGGGACCATGCAAAAACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGCAACTCT 1200
 ATGTTTCCCTCATGTTGCTGTACAAAACCTACGGATGGAATGACCTGTATTCCCATC 1260
 CCATCGTCTGGGCTTTCGCAAAAATACCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCTTGG 1320
 CTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTCAAGTGGTTCGTAGGGCTTCCCCACTGTTTGGCTT 1380
 TCAGCTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCGTGAGTCCCTTT 1440
 ATACCGCTGTTACCAATTTTCTTTTGTCTCTGGGTATACATTTAA 1485

5

SEC ID N° 17

Secuencia de aminoácidos

MMAPGTHCGHNVDSLKAINLNGVNFNNVDASSLGAAHVGQSASRGRGLGENPDDEEGDAK	60
KKKDGKKAEPKNPRENKLKQPGDRADGQAAGNGAGGQPAGDRAAGQPAGDRAAGQPAGDG	120
AAGQPAGDRADGQPAGDRADGQPAGDRAAGQAAGNGAGGQAAANGAGNQPGGGNAANKKA	180
EDAGGNAGGNAGGQGQNNEGANAPNEKSVKEYLDKVRATVGTETWPCSVTCGVGVRVRRR	240
VNAANKKPEDLTLNDLETDVCTPGPVINMENITSGFLGPLLVLQAGFFLLTRILTIPQSL	300
DSWWTSLNFLGGSPVCLGQNSQSPTSNSHSPTSCPPICPGYRWMCLRRFIIFFILLCLI	360
FLLVLLDYQGMLPVCPLIPGSTTTNTGPKCTCTTPAQNSMFPSCCCTKPTDGNCTCIPI	420
PSSWAFAYLWEWASVRFWSLSLLVPFVQWVGLSPTVWLSAIWMMWYWGPSLYSIVSPF	480
IPLLPIFFCLWVYI	494

SEC ID N° 18

5 La secuencia de nucleótidos del casete de expresión RTS y el producto de traducción predicho de la proteína híbrida RTS-HBsAg.

El producto de la traducción iniciado a partir del codón ATG de TDH3 se muestra debajo de la secuencia de ADN.

AAGCTTACCAGTTCTCACACGGAACACCACTAATGGACACAAATTCGAAATACTTTGACC

CTATTTTCGAGGACCTTGTCACCTTGAGCCCAAGAGAGCCAAGATTTAAATTTTCCTATG

ACTTGATGCAAATTCCTCAAAGCTAATAACATGCAAGACACGTACGGTCAAGAAGACATAT
 TTGACCTCTTAACTGGTTCAGACGCGACTGCCTCATCAGTAAGACCCGTTGAAAAGA
 TACCTGAAAAAACGAATATATACTAGCGTTGAATGTTAGCGTCAACAACAAGAAGTTTA
 ATGACGCGGAGGCCAAGGCAAAAAGATTCCCTTGATTACGTAAGGGAGTTAGAATCATTTT
 GAATAAAAAACACGCTTTTTTCAGTTCGAGTTTATCATTATCAATACTGCCATTTCAAAGA
 ATACGTAAATAATTAATAGTAGTATTTTCCCTAACTTTATTTAGTCAAAAATTAGCCTTT
 TAATTCTGCTGTAACCCGTACATGCCCAAATAGGGGGCGGGTTACACAGAATATATAAC
 ATCGTAGGTGCTGGGTGAACAGTTTATCCCTGGCATCCACTAAATATAATGGAGCTCGC
 TTTTAAGCTGGCATCCAGAAAAAAAAGAATCCCAGCACCAAATATTGTTTTCTTACC
 AACCATCAGTTCATAGGTCCATTCTTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAG
 GCAAAAAACGGGCACAACTCAATGGAGTGATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACAC
 AAGGCAATTGACCCACGCATGTATCTATCTCATTCTTACACCTTCTATTACCTTCTGC
 TCTCTCTGATTTGAAAAAGCTGAAAAAAGGTTGAAACCAGTTCCTGAAATTATTCC
 CCTACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTATTGATTGTAATCTGTAAATCTGTAATCTAT
 TTCTTAACTTCTTAAATTCTACTTTTATAGTTAGTCTTTTTTTTAGTTTTAAACACCA
 AGAACTTAGTTTCGAATAAACACACATAAACAAACAAAATGATGGCTCCCGATCCTAATG
 MetMetAlaProAspProAsnA
 CAAATCCAATGCAAACCCAAATGCAAACCCAAACGCAAACCCCAATGCAAATCCTAATG
 LaAsnProAsnAlaAsnProAsnAlaAsnProAsnAlaAsnProAsnAlaAsnProAsnA
 CAAACCCCAATGCAAATCCTAATGCAAATCCTAATGCCAATCCAATGCAAATCCTAATG
 LaAsnProAsnAlaAsnProAsnAlaAsnProAsnAlaAsnProAsnAlaAsnProAsnA
 CAAACCCAAACGCAAACCCCAATGCAAATCCTAATGCCAATCCAATGCAAATCCTAATG
 LaAsnProAsnAlaAsnProAsnAlaAsnProAsnAlaAsnProAsnAlaAsnProAsnA
 CAAACCCCAATGCAAACCCCAATGCAAACCCCAATGCAAATCCTAATAAAAACAATCAAG
 LaAsnProAsnAlaAsnProAsnAlaAsnProAsnAlaAsnProAsnLysAsnAsnGlnG
 GTAATGGACAAGGTCACAATATGCCAATGACCCAAACCGAAATGTAGATGAAAATGCTA
 LyAsnGlyGlnGlyHisAsnMetProAsnAspProAsnAspProAsnArgAsnValAspGluAsnAlaA
 ATGCCAACAATGCTGTAAAAAATAATAATAACGAAGAACCAAGTGATAAGCACATAGAAC
 snAlaAsnAsnAlaValLysAsnAsnAsnAsnGluGluProSerAspLysHisIleGluG
 AATATTTAAAGAAAATAAAAAATTCTATTTCAACTGAATGGTCCCCATGTAGTGAACCTT
 LnTyrLeuLysLysIleLysAsnSerIleSerThrGluTrpSerProCysSerValThrC
 GTGGAAATGGTATTCAAGTTAGAATAAAGCCTGGCTCTGCTAATAAACCTAAAGACGAAT
 YsGlyAsnGlyIleGlnValArgIleLysProGlySerAlaAsnLysProLysAspGluL
 TAGATTATGAAAATGATATTGAAAAAATTTGTAATGAAAAGTGCTCGAGTGTGT
 euAspTyrGluAsnAspIleGluLysLysIleCysLysMetGluLysCysSerSerValP
 TTAATGTCGTAAATAGTCGACCTGTGACGAACATGGAGAACATCACATCAGGATTCCTAG

HeAsnValValAsnSerArgProValThrAsnMetGluAsnIleThrSerGlyPheLeuG
 GACCCCTGCTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTCTTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCGC
 LyProLeuLeuValLeuGlnAlaGlyPhePheLeuLeuThrArgIleLeuThrIleProG
 AGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTCTAGGGGGATCACCCGTGTCTTG
 LnSerLeuAspSerTrpTrpThrSerLeuAsnPheLeuGlyGlySerProValCysLeuG
 GCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAACCTCCTGTCCTCAATTTGTC
 LyGlnAsnSerGlnSerProThrSerAsnHisSerProThrSerCysProProIleCysP
 CTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGCGTTTTATCATATTCCTCTTCATCCTGCTGCTAT
 RoGlyTyrArgTrpMetCysLeuArgArgPheIleIlePheLeuPheIleLeuLeuLeuC
 GCCTCATCTTCTTATTGGTCTTCTGGATTATCAAGGTATGTTGCCGTTTGTCCCTCTAA
 YsLeuIlePheLeuLeuValLeuLeuAspTyrGlnGlyMetLeuProValCysProLeuI
 TTCCAGGATCAACAACAACCAATACGGGACCATGCAAAACCTGCACGACTCCTGCTCAAG
 LeProGlySerThrThrThrAsnThrGlyProCysLysThrCysThrThrProAlaGlnG
 GCAACTCTATGTTTCCCTCATGTTGCTGTACAAAACCTACGGATGGAAATTGCACCTGTA
 LyAsnSerMetPheProSerCysCysCysThrLysProThrAspGlyAsnCysThrCysI
 TTCCCATCCCATCGTCCTGGGCTTTCGCAAAATACCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTT
 LeProIleProSerSerTrpAlaPheAlaLysTryLeuTrpGluTrpAlaSerValArgP
 TCTCTTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTCCCCACTG
 HeSerTrpLeuSerLeuLeuValProPheValGlnTrpPheValGlyLeuSerProThrV
 TTTGGCTTTTTCAGCTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCGTGA
 AlTrpLeuSerAlaIleTrpMetMetTrpTyrTrpGlyProSerLeuTyrSerIleValS
 GTCCTTTTATACCGCTGTTACCAATTTCTTTTGTCTCTGGGTATACATTTAACGAATTC
 ErProPheIleProLeuLeuProIlePhePheCysLeuTrpValTyrIleEnd
 CAAGCTGAAACAATTCAAAGGTTTTCAAATCAATCAAGAACTTGTCTCTGTGGCTGATCC
 AAATAACAATTTATGCATTGTCTGCCAAGACATCAAGAAGAAGTTAGTGATGATGTCTT
 TTATGGAGAGCATTCCATAGTCTTTGAAGAAGCAGAAAACAGATTATATGCAGCTATGTC
 TGCCATTGATATCTTTGTTAATAATAAAGGTAATTTCAAGGACTTGAAATAATCCTTCTT
 TCGTGTCTTAATAACTAATATATAAATACAGATATAGATGCATGAATAATGATATACAT
 TGATTATTTTGCATGTCAATTAATAAAAAAAAAATGTTAGTAAACTATGTTACATTCCA
 AGCAAATAAAGCACTTGGTTAAACGAAATTAACGTTTTTAAGACAGCCAGACCAGCGGTCT
 AAAAATTTAAATATACACTGCCAACAATTCCTTCGAGTTGTCCAATTTACCACCTTTTA
 TATTTTCATCAACTTCAGCAGATTCAACCTTCTCACATAGAACATTGGAATAAACAGCCT
 TAACACCCTTTCAAGTTTGCACAGCGTAATATGAGGAATTTTGTGTTTGGACAACACAACC
 CTTTAATTTTCTCATTGTTTTTCATCAATTATGCATCCATCTTTATCTTTAGACAGTTCCA
 CTACAATAGCAATAGTTTTTTCATCCCAACATAGTTTTTTCGAGCCTAAAATTCAGTTTGT
 CGGTCGTTTTTACCTGCGTATTTTTGGTTATTACCAGAGCCTTGTGCATTTTCTATGCGGT

ES 2 525 732 T3

TGTTATTG TACTCCGTTATCTGGTCAGTGTATCTGTTACAATATGATTCCACAAC TTTTT
TGCCTCTTTTTCACGGGACGACATGACATGACCTAATGTTATATGAAGTTCCTTCTGAAC
TTTTCCACTAGCTAGTAAATGCTTGAATTTCTCAGTCAGCTCTGCATCGCTAGCAATACA
CCTCTTGACCAATCAATAATTCATCGTAGTTTTCTATTTAGCTGAGATATATGTAGGT
TTAATTAAC TTAGCGTTTTTTGTTGATTATTGTTGCCTTTACCAACTATTTTTCTCACAG
TAGGTTTGAATCTAAGCTCCTTCTGAACGCTGTCTCAATTCATCATCTTTCGGGATCT
CTGGTACCAAAATTGGATAAGCTT

REVINDICACIONES

1. Una partícula de proteína inmunogénica que comprende los siguientes monómeros:
 - a. Una proteína de fusión que comprende secuencias antigénicas de una proteína CS de *P. vivax*, y el antígeno S de la hepatitis B (CSV-S), y
 - 5 b. una proteína de fusión que comprende secuencias derivadas a partir de la proteína CS de *P. falciparum*, y el antígeno S de la hepatitis B (RTS), y
 - c. opcionalmente el antígeno S de la hepatitis B.
2. Una partícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el antígeno de hepatitis B se deriva a partir de un serotipo adw.
- 10 3. Una partícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además uno o más antígenos adicionales de *P. falciparum* y/o *P. vivax*.
4. Una partícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende la secuencia de proteínas del circumsporozoíto híbrida mostrada en la SEC ID N° 13.
- 15 5. Una composición que comprende una partícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y un adyuvante.
6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el adyuvante es seleccionado del grupo que comprende:
 - sales de metales, tales como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio,
 - emulsiones de aceite en agua,
 - 20 • agonistas del receptor tipo Toll (tales como el agonista 2 del receptor tipo Toll, el agonista 3 del receptor tipo Toll, el agonista 4 del receptor tipo Toll, el agonista 7 del receptor tipo Toll, el agonista 8 del receptor tipo Toll y el agonista 9 del receptor tipo Toll),
 - saponinas, por ejemplo Quil A y sus derivados, tales como QS7 y/o QS21,
 - oligonucleótidos que contienen CpG,
 - 25 • 3D-MPL,
 - (2-desoxi-6-O-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxi-tetra-decanoil-amino]-4-o-fosfono-β-D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxi-tetradecanoil-amino]-α-D-glucopiranosilhidrogenofosfato),
 - DP (1,10-bis-(dihidrogen-fosfato) de (3S,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxi-tetradecanoil-amino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxi-tetradecanoil-amino]-decano-1,10-diol), y
 - 30 • MP-Ac DP (10-(6-amino-hexanoato) de 1-dihidrogen-fosfato de (3S-,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxi-tetradecanoil-amino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxi-tetradecanoil-amino]-decano-1,10-diol),
 o combinaciones de los mismos.
7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en en la que el adyuvante es seleccionado del grupo que comprende:
 - 35 • una saponina asociada con una sal metálica, tal como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio,
 - 3D MPL, QS21, y un oligonucleótido CpG, por ejemplo, como una formulación de aceite en agua,
 - saponina en la forma de un liposoma, por ejemplo comprendiendo además un esteroles, tal como QS21 y esteroles, y
 - ISCOM.
- 40 8. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, que comprende además uno o más antígenos adicionales derivados de *P. falciparum* y/o *P. vivax* en mezcla.

9. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en la que la composición es una vacuna para uso parenteral.
10. Una partícula como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, para su uso en medicina.
- 5 11. Uso de una partícula como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento/la prevención del paludismo.
12. Una partícula como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, para su uso en el tratamiento de un paciente susceptible de infección por plasmodio, en particular como una vacuna.
- 10 13. Un vector o plásmido que comprende una o más secuencias de ADN que codifican los componentes de una partícula como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho vector o plásmido es adecuado para insertar dicho ADN en un huésped, para la fabricación de la partícula o dicho vector o plásmido es capaz, en las condiciones apropiadas, de fabricar los componentes, que se ensamblan en la partícula.
- 15 14. Un huésped transformado con un vector o plásmido como se define en la reivindicación 13.
15. Un huésped que comprende una o más secuencias de ADN que codifican los componentes de una partícula como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para fabricar la partícula.
16. Un proceso para la producción de una partícula como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, cuyo proceso comprende expresar una secuencia de nucleótidos que codifica dichas proteínas en un huésped adecuado, y recuperar el producto.
- 20 17. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que el huésped es una levadura.
18. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la levadura se selecciona del grupo que comprende:
- 25 *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia* (e.g. *Pichia pastoria*), *Hansenula* (e.g. *Hansenula polymorpha*), *Varowia*, *Schwaniomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygoaccharomyces*, such as *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsberoensis*, *K. Lactis*, Y1834 y DC5.
19. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que el producto es recuperado mediante lisis de las células huésped, mediante su tratamiento con una composición adecuada que comprende un tensoactivo.
20. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el tensoactivo es seleccionado del grupo que comprende:
- 30 Tween (tal como Tween 20), brijji, polietileno, y glicol.

35

40

FIG.1

Mapa del plásmido pRIT15546

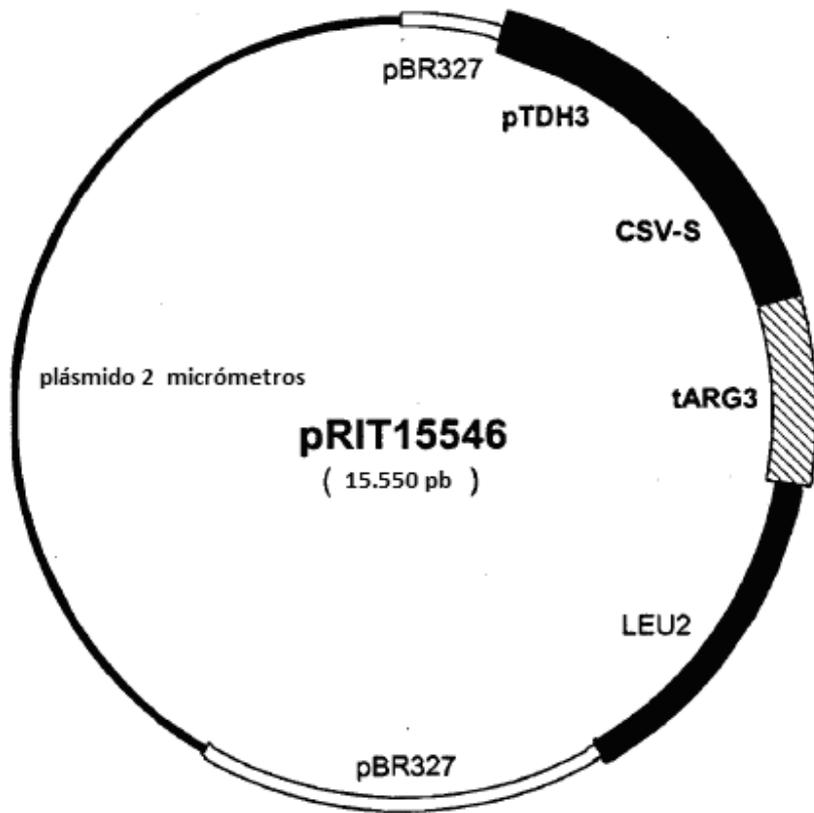


FIG 2

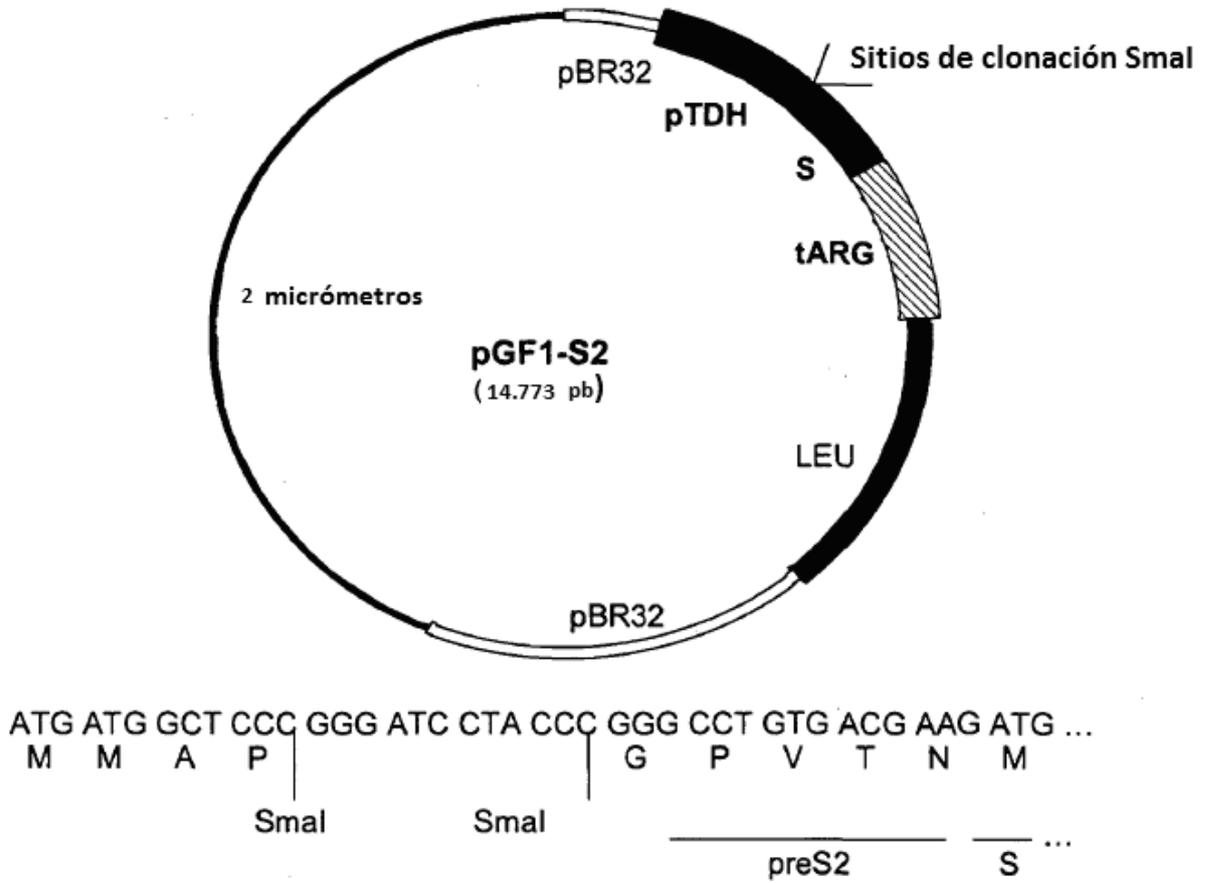


Figura 3: Mapa del plásmido de **pRIT15582**.

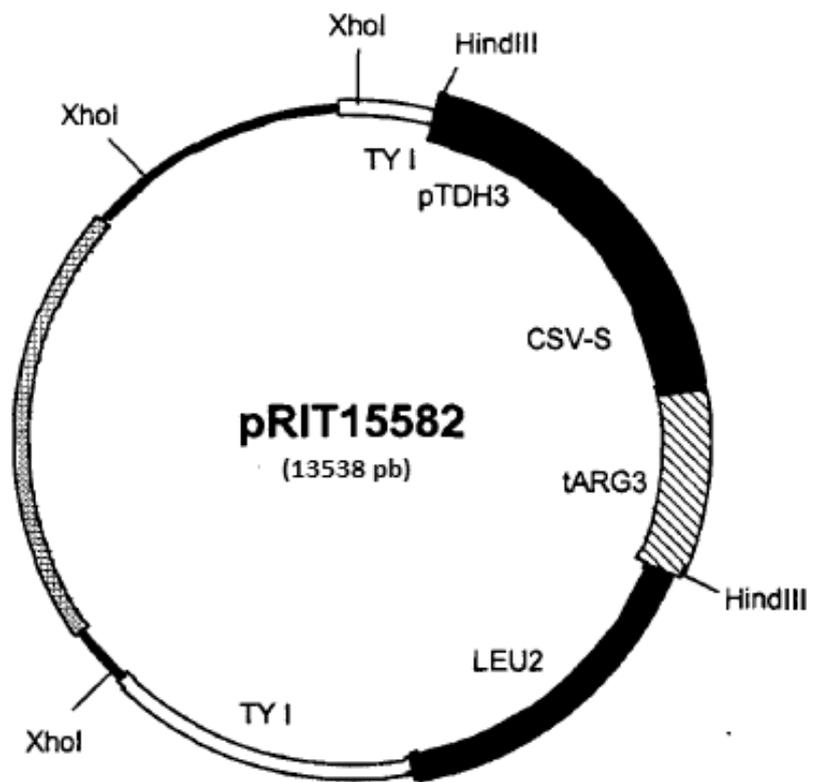


Figura 4: Mapa de restricción del fragmento lineal XhoI usado para integrar el casete CSV-S

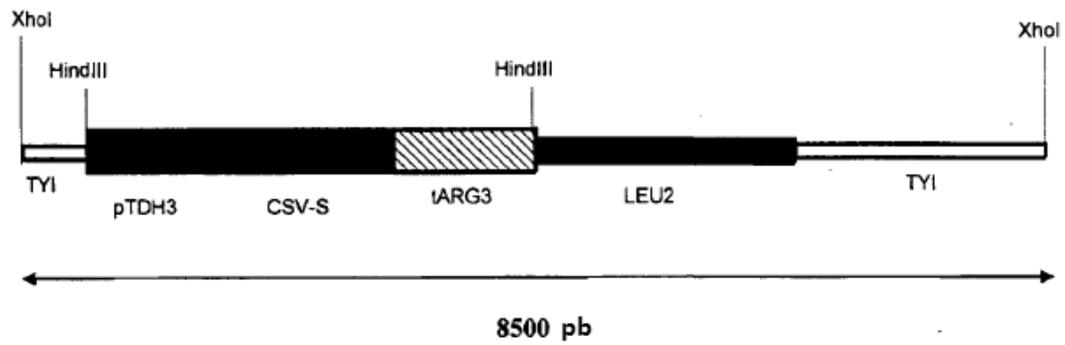


Figura 5: Transferencia Western de las proteínas recombinantes expresadas en la cepa Y1835.

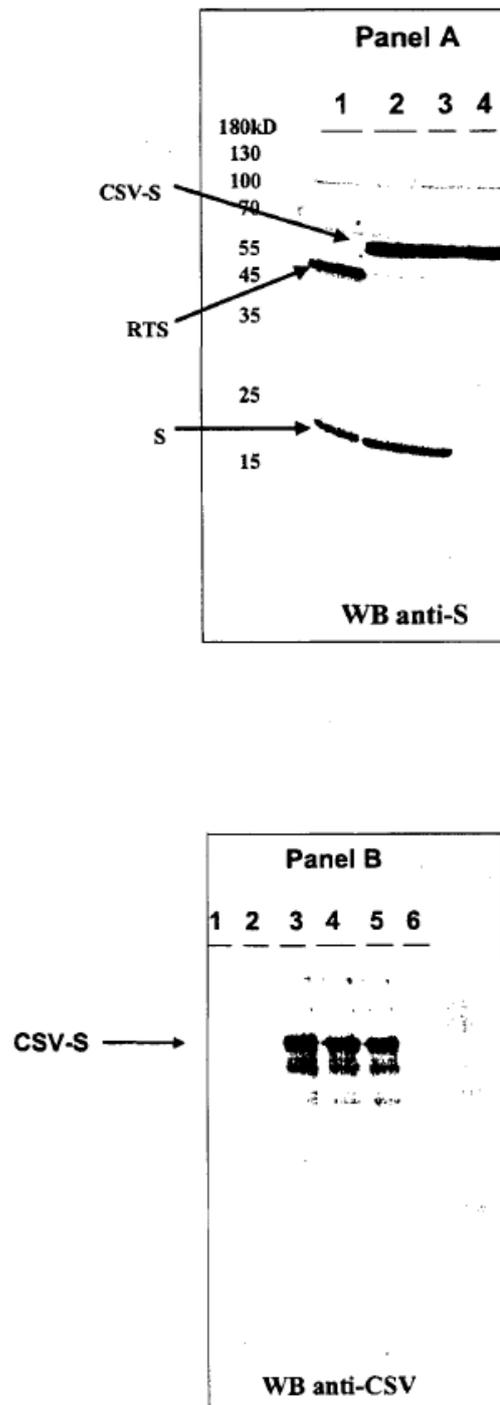


Figura 6: Micrografía electrónica de partículas mixtas de CSV-S,S producidas en la cepa Y1835

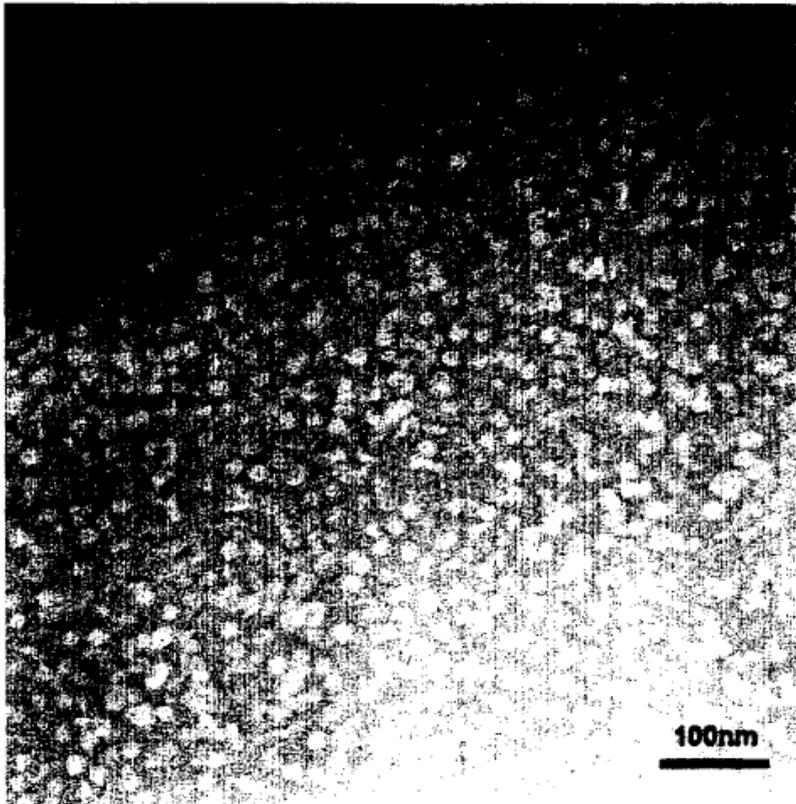


Figura 7: Transferencia Western de proteínas recombinantes expresadas en la cepa Y1845.

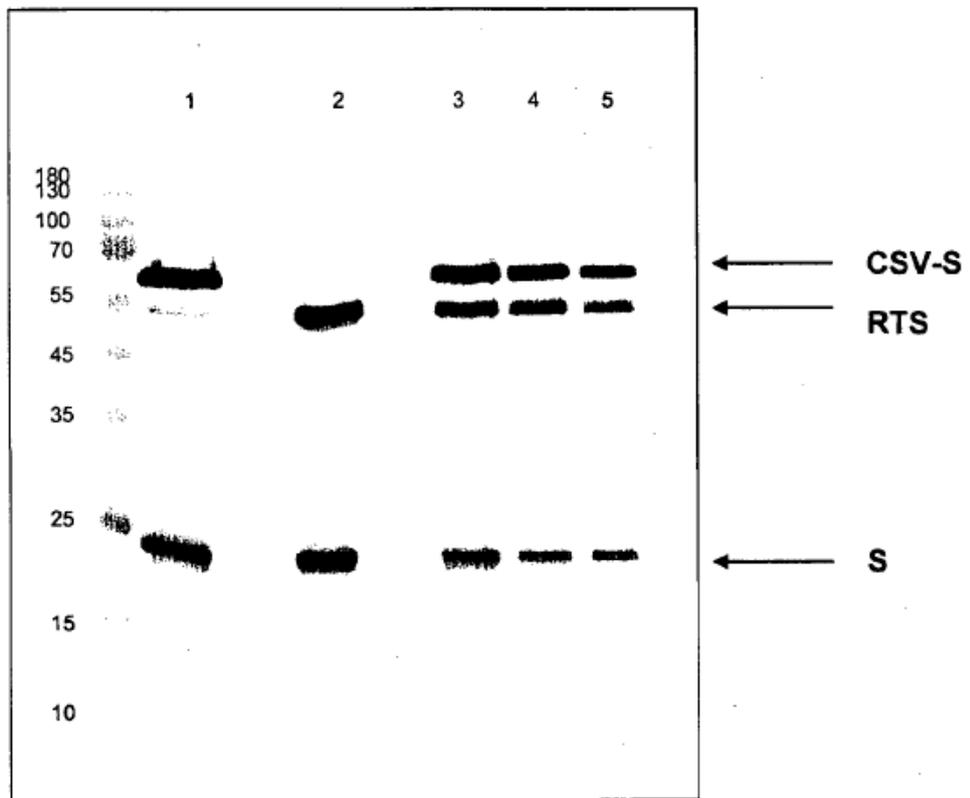


Figura 8: Análisis de densidad CsCl de un extracto acelar preparado a partir de la cepa Y1845.

