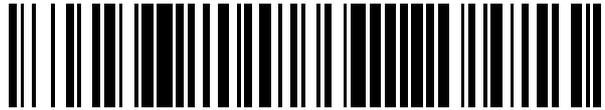


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 347**

51 Int. Cl.:

A01K 67/033 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2003 E 08013181 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 2000026**

54 Título: **Insectos de especies de Anopheles asépticos, esporozoitos de especies de Plasmodium asépticos obtenidos a partir de los mismos y una vacuna que comprende esporozoitos de especies de Plasmodium asépticos**

30 Prioridad:

05.04.2002 US 370581 P

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

09.01.2015

73 Titular/es:

**SANARIA INC. (100.0%)
9800 Medical Center Drive - A209
Rockville, MD 20850, US**

72 Inventor/es:

**HOFFMAN, STEPHEN L. y
LUKE, THOMAS C.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 526 347 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

Insectos de especies de *Anopheles* asépticos, esporozoitos de especies de *Plasmodium* asépticos obtenidos a partir de los mismos y una vacuna que comprende esporozoitos de especies de *Plasmodium* asépticos

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere a mosquitos *Anopheles* y a esporozoitos de *Plasmodium* así como a vacunas como se define en las reivindicaciones. Adicionalmente se describen aparatos y métodos para la producción de cepas de insectos (por ejemplo, mosquitos *Anopheles*) que tienen propiedades deseadas tales como hipoalergenicidad e hiperinfectividad. También se divulgan métodos para producir una cepa de un parásito que puede resistir a la criopreservación a temperaturas cercanas a la congelación. La presente invención también se refiere a aparatos y métodos para la inyección de una vacuna de parásitos atenuada. La presente invención permite la producción de parásitos y mosquitos *Anopheles* que carecen de contaminación por agentes biológicos no deseados tales como bacterias y otros microorganismos. Los aparatos divulgados en el presente documento proporcionan la reconstrucción de ciclos de vida parasitarios complejos asépticamente, de modo que se impida la contaminación bien del parásito o del hospedador vector insecto con agentes biológicos no deseados. También se divulgan métodos para la producción de una vacuna atenuada del esporozoito de *Plasmodium* que es estable a temperaturas criogénicas relativamente superficiales. También se divulgan aparatos para la administración de vacunas en cantidades de micro-bolos.

Descripción de los antecedentes

La malaria es la enfermedad parasitaria más devastadora, y como tal representa uno de los problemas sanitarios públicos más importantes en todo el mundo. De acuerdo con los expertos en el campo, la malaria infecta a 300 millones de personas y mata hasta 3 millones de personas al año. Una vacuna para la malaria reduciría drásticamente el impacto de esta peligrosa enfermedad.

Los agentes causantes de la malaria son diversas especies del género eucariota *Plasmodium*, incluyendo *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium malariae*. Estos parásitos tienen un ciclo de vida muy complejo que implica hospedadores tanto vertebrados como invertebrados. La forma infectiva de vertebrados del parásito (esporozoitos) está presente en las glándulas salivares de los mosquitos (normalmente del género *Anopheles*) y los esporozoitos se transfieren a seres humanos durante la alimentación de los mosquitos. En el hospedador humano, los esporozoitos inicialmente infectan las células del hígado y eventualmente los eritrocitos. Esta infección da como resultado una enfermedad que es potencialmente letal para los infectados.

Las estrategias profilácticas actuales contra la malaria incluyen el uso de fármacos, incluyendo cloroquina, mefloquina y atovaquona/proguanil. Sin embargo, recientemente se han observado múltiples cepas resistentes a fármacos de *Plasmodium*. Además, se piensa que la aparición de cepas resistentes a fármacos de malaria está promovida por el uso de estos fármacos profilácticos antimalaria. Por consiguiente, deben abordarse esfuerzos significativos para desarrollar una vacuna para la malaria.

Hay algunas indicaciones en la bibliografía científica de que una vacuna para la malaria podría ser eficaz. Con respecto a una vacuna de esporozoitos completa metabólicamente activa no replicante (atenuada), Nussenzweig y colaboradores (Nature 216: 160-162; 1967) publicaron esa inmunización de ratones con esporozoitos de *Plasmodium berghei* atenuados con radiación. Estos estudios con roedores proporcionaron el impulso para estudios en seres humanos, y durante los años 1970, Clyde, Rieckmann y colaboradores (Clyde *et al.*; Am. J. Med. Sci. 266: 169-177; 1973; Clyde *et al.* Am. J. Med. Sci. 266: 398-401; 1973; Rieckmann *et al.* Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 68: 258-259; 1974) dirigieron estudios limitados que establecieron que la inmunización de voluntarios humanos con las picaduras de mosquitos irradiados portadores de esporozoitos de *Plasmodium falciparum* en sus glándulas salivares protegerían a los voluntarios contra una exposición con esporozoitos completamente infecciosos de *Plasmodium falciparum*. Hoffman y Luke (Hoffman *et al.*; J. Infect. Dis. 185: 1155-1164; 2002) establecieron el potencial completo de esta estrategia describiendo los resultados de una experiencia clínica de 10 años con inmunizaciones con el mosquito vivo y exposiciones, y combinaron sus resultados con todos los informes clínicos publicados de la inmunización de seres humanos con esporozoitos de *Plasmodium* irradiados.

Los 3 puntos siguientes resumen los descubrimientos más importantes: 1) Trece de 14 voluntarios inmunizados por las picaduras de más de 1000 mosquitos irradiados infectados se protegieron contra el desarrollo de infección por *P. falciparum* en la fase eritrocitaria cuando se expusieron a las 10 semanas de su última inmunización primaria; 2) Cinco de 6 de los 14 voluntarios (1) anteriores cuando se expusieron de 23 a 42 semanas (23, 36, 39, 41 y 42 semanas) después de su última inmunización primaria o secundaria se protegieron contra la exposición experimental; y 3) Siete de siete exposiciones heterólogas (inmunizados con una cepa de *P. falciparum* y expuestos con otra cepa de *P. falciparum*) en cuatro individuos se asoció con protección completa.

A partir de esto, se demostró que la protección podía conseguirse en más del 90 % de los sujetos inmunizados, duró al menos 10 meses, y se demostró protección entre cepas cruzadas (heteróloga). Por primera vez, se demostró la eficacia verdadera de esta estrategia de vacuna experimental. Aunque este estudio demostró la viabilidad de una vacuna de la malaria atenuada, se consideró por muchas razones que no era práctica para inmunizar grandes cantidades de individuos susceptibles empleando las picaduras de mosquitos infectados irradiados.

Un impedimento técnico para el desarrollo de una vacuna clínicamente relevante es la producción de esporozoitos asépticos que están libres de contaminación por agentes biológicos no deseados. Actualmente, no es posible producir esporozoitos de *Plasmodium falciparum* usando un proceso *in vitro*. Por tanto, los esporozoitos de *Plasmodium falciparum* deben obtenerse a partir de los tejidos de mosquitos *Anopheles* hembra infectados. Sin embargo, se sabe bien que los mosquitos silvestres y los criados en insectarios están altamente contaminados con agentes biológicos no deseados incluyendo bacterias, mohos y hongos. Esta contaminación impide en gran medida el uso de parásitos derivados de mosquitos en una vacuna clínicamente relevante adecuada de cara a una concesión de licencia reguladora. Un aparato y método para producir mosquitos *Anopheles* asépticos para la producción *in vivo* de esporozoitos de *Plasmodium falciparum* es una etapa crítica en el desarrollo de una vacuna de esporozoitos atenuada aceptable desde una perspectiva tanto clínica como reguladora.

La contaminación de mosquitos con agentes biológicos no deseados puede originarse de diversas fuentes en el ciclo de vida del mosquito. La superficie de los huevos del mosquito puede contaminarse durante la oviposición desde el tracto genital y los oviposidores del mosquito hembra. Las larvas pueden tener microbios en su tracto gastrointestinal y membrana peritrófica durante la metamorfosis de larvas a pupas y a mosquitos adultos. Además, factores ambientales múltiples, incluyendo el hábitat acuático de las larvas, el entorno externo del mosquito adulto, y la piel contaminada de un animal de la cual se alimenta el mosquito, pueden contribuir a la contaminación de los mosquitos y por tanto del parásito *Plasmodium*.

Durante décadas, los esporozoitos no asépticos se han obtenido rutinariamente a partir de mosquitos de *Anopheles* infectados para fines de investigación usando técnicas laboriosas. Existen múltiples inconvenientes para esta estrategia convencional. Dado que todo el proceso se realiza en condiciones no estériles, la preparación de los esporozoitos se contamina normalmente con microbios. Aunque los esporozoitos pueden purificarse parcialmente mediante diversas técnicas, la contaminación del producto resultante hace que este sea inadecuado para el uso del desarrollo de una vacuna para uso en seres humanos. Las vacunas contaminadas con microbios pueden producir una infección iatrogénica de una naturaleza grave tanto en seres humanos como en animales. Además, los procesos de la técnica anterior para la cría de mosquitos no asépticos son laboriosos y requieren múltiples manipulaciones directas de los mosquitos durante su ciclo de vida.

Por consiguiente, una de las limitaciones en la producción de una vacuna para la malaria es la capacidad de obtener una gran cantidad de esporozoitos asépticos de especies de *Plasmodium*. Como se ha indicado anteriormente, los esporozoitos que se obtienen de especies de *Anopheles* de mosquitos usando técnicas convencionales dan como resultado esporozoitos que no son útiles en el desarrollo de una vacuna de esporozoitos atenuada. Los esporozoitos asépticos podrían usarse como una vacuna para generar respuestas inmunológicas protectoras de un modo seguro y eficaz. Además, la producción de dichos esporozoitos asépticos será un requisito regulador para la producción comercial de una vacuna para la malaria.

Por tanto, desde hace mucho tiempo ha habido una necesidad en el campo médico de la producción de especies de *Plasmodium* asépticas, esporozoitos y mosquitos *Anopheles* asépticos para su uso en el desarrollo de una vacuna para la malaria. Los aparatos y métodos para la cría aséptica de mosquitos *Anopheles* y parásitos de *Plasmodium* pueden también usarse para la producción aséptica de otras especies de insectos hematófagos y parásitos para otras vacunas críticamente necesarias contra enfermedades parasitarias de seres humanos y animales.

Para desarrollar cepas de insectos que posean determinadas propiedades deseadas (por ejemplo, hiperinefectividad o hipoadergenecidad), sería útil emplear un dispositivo que pudiese permitir realizar experimentos para evaluar selectivamente en el comportamiento de la picadura y propiedades de los insectos individuales. El aparato sería útil también en la selección de insectos que poseyesen propiedades deseadas.

Un impedimento adicional para un desarrollo eficaz y económico de una vacuna atenuada para la malaria es el efecto perjudicial que el parásito *Plasmodium* tiene sobre el mosquito hospedador. Los mosquitos *Anopheles* son capaces de transmitir esporozoitos de *Plasmodium* al animal hospedador del cual se alimentan. La investigación indica que las infecciones por *Plasmodium* de los mosquitos hembra de *Anopheles* son perjudiciales para la supervivencia de los mosquitos tanto en el laboratorio como en el entorno natural. Por tanto, la capacidad de extraer grandes cantidades de parásitos en fase mosquito de hembras de mosquito está actualmente limitada por la incapacidad de los mosquitos para tolerar una gran carga del parásito *Plasmodium*.

Una sola cepa del mosquito *Anopheles* que fuera tolerante a infección masiva con el parásito *Plasmodium* haría que la producción y la extracción de esporozoitos de mosquitos fuese más eficaz. El desarrollo de una vacuna de esporozoitos de *Plasmodium* atenuada derivada de esta única cepa de mosquitos *Anopheles* sería por lo tanto más eficaz y económica.

Una posible dificultad adicional en la producción de vacunas vivas, atenuadas o de patógenos muertos, extraídos de los tejidos del mosquito es el potencial de los antígenos del mosquito para causar hipersensibilidad, reacciones de Arthus o de tipo hipersensibilidad retardada en el ser humano o animal inoculado. Se han identificado numerosos antígenos salivares de hipersensibilidad en varias especies de mosquitos. Estos antígenos salivares probablemente confieren una ventaja de supervivencia a los mosquitos de tipo silvestre por numerosas razones. Sin embargo, en poblaciones de mosquitos mantenidas en laboratorio, dichos antígenos son vestigios de sus ancestros silvestres y probablemente ya no son necesarios para la ventaja de supervivencia selectiva. Desarrollando una técnica para crear mosquitos hipoalergénicos, sería posible crear varias especies de mosquitos hipoalergénicos (*Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, etc.) que sean específicas para una amplia variedad de infecciones transmitidas por mosquitos. Estas cepas hipoalergénicas de mosquitos serían de utilidad significativa en la producción de vacunas para parásitos atenuadas inocuas y eficaces.

Una vez que se ha desarrollado una vacuna atenuada, la vacuna debería administrarse a un individuo que la necesitase realmente. Sin embargo, la manera convencional en la que se suministran las vacunas - inyección de un bolo mediante una jeringa - no es eficaz en el caso de una vacuna atenuada de la malaria. Las jeringas para vacunas se encuentran normalmente disponibles en varios tamaños con un puerto de cierre industrial convencional en el que pueden acoplarse agujas de varios tamaños. Normalmente, este sistema es adecuado para vacunas típicas, ya que el volumen necesario está en el intervalo de 500 a 1000 microlitros. Pequeñas variaciones de volumen de inmunización a inmunización no tienen efecto sobre la inmunogenicidad de la vacuna típica.

Sin embargo, en algunas vacunas, tales como una vacuna de esporozoitos de *Plasmodium* atenuada, el inóculo puede ser del orden de un microlitro o menor - similar a la inyección de un mosquito sonda. Volúmenes más grandes pueden causar que el líquido transportador de la vacuna altere la integridad tisular y hacer que el líquido siga los planos tisulares. En ratones, prácticamente todos los estudios de exposición a esporozoitos y estudios de inmunización con esporozoitos atenuados se realizan mediante inyección intravenosa de esporozoitos, porque la administración no intravenosa de esporozoitos en la piel, tejido subcutáneo y muscular se ha asociado con tasas de infección y tasas de protección mucho más bajas. Cuando se inyectan en la piel, los esporozoitos probablemente mueren dentro de los espacios entre los planos tisulares creados por el líquido en el que se suspenden los esporozoitos, sin proporcionar la oportunidad para moverse a través de las estructuras celulares hospedadoras y en un capilar.

El procedimiento convencional para las vacunas actuales es por tanto inadecuado para una vacuna de volumen ultra-bajo. Para superar esta limitación, se podría diseñar una micro aguja de un solo uso y un ensamblaje de jeringuilla. Aunque esta estrategia probablemente sería eficaz, no sería práctica de realizar ya que en países extremadamente pobres se proporcionan millones de vacunas. Preferentemente, un sistema de administración de la vacuna de la malaria podría administrarse tanto en bolos de volumen ultra-bajo como también emplear ensamblajes de jeringa convencionales como una medida de ahorro.

También existen impedimentos para la administración de la vacuna de *Plasmodium* atenuada congelada a individuos en todo el mundo. Los esporozoitos de *Plasmodium* tienen la capacidad de sobrevivir a temperaturas de congelación en diversas soluciones de conservación. Los mejores resultados, medidos después del recalentamiento y estimación del porcentaje de esporozoitos móviles y la capacidad para producir una infección patente de fase eritrocitaria después de inyección en un animal de estudio, demuestran que temperaturas extremadamente bajas (de -196 a -70 grados Celsius) pueden conservar a los esporozoitos durante muchos años. Sin embargo, dado que las temperaturas de conservación se aproximan a cero grados Celsius, el porcentaje de esporozoitos viables en función del tiempo cae precipitadamente de una manera dependiente de la temperatura. Esta caída en la viabilidad limita la utilidad de las vacunas de la malaria derivadas de esporozoitos atenuados que deben conservar un alto grado de potencia durante la conservación y distribución.

El almacenamiento en frío y la infraestructura de distribución en todo el mundo son sólidos y casi todos los países tienen la capacidad de conservar volúmenes relativamente grandes de materiales a temperaturas próximas a los cero grados Celsius. Cerca de los cero grados Celsius, se pueden utilizar los equipos y la infraestructura existente para transportar una vacuna de esporozoitos atenuada a incluso localizaciones más remotas en la tierra. Una infraestructura de conservación y distribución que requiere temperaturas en el intervalo de menos setenta grados Celsius, aunque es técnicamente viable, posiblemente solo es rutinariamente posible en las naciones más avanzadas tecnológicamente. No obstante, dichas temperaturas frías extremas requieren equipos especiales, cuidados y probablemente conlleven un gran gasto de capital para adecuar la logística del suministro de una vacuna de esporozoitos atenuada.

Los estudios de criopreservación de esporozoitos han usado cepas de *Plasmodium* y clones desarrollados para fines distintos al desarrollo de una cepa tolerante al frío de esporozoitos de *Plasmodium*. Todos los organismos, hasta cierto nivel, tienen la capacidad de sobrevivir a variaciones de temperatura utilizando proteínas estabilizadoras, proteínas de choque térmico, azúcares e hidratos de carbono que previenen la desnaturalización de enzimas críticas, proteínas o limitan el daño a los sustratos celulares ocasionados por la formación de cristales de hielo. El parásito de la malaria, cuyo ciclo de vida incluye el paso a través del mosquito *Anopheles*, debe tener la capacidad de resistir variaciones naturales de temperatura - algunas veces muy extremas ya que muchos climas de

temperatura/tropicales pueden variar de treinta a cincuenta grados Fahrenheit en un ciclo de día-noche. Puede suponerse que la variación genética del organismo *Plasmodium* respecto a los organismos en la naturaleza ha conducido a una amplia variación en la capacidad de los esporozoitos para resistir temperaturas extremas.

5 La clave para desarrollar una especie de *Plasmodium* que pueda sobrevivir mejor a condiciones de criopreservación a altas temperaturas es reproducir selectivamente los esporozoitos que muestran que tienen esta capacidad. Seleccionando estos esporozoitos con aumento de la supervivencia a altas temperaturas de criopreservación durante períodos de tiempo más largos mientras son aún capaces de completar un ciclo de vida natural, se puede desarrollar una cepa de *Plasmodium* que tenga una mayor utilidad en una vacuna parasitaria completa atenuada para uso a nivel mundial.

Sumario de la invención

15 De acuerdo con la presente invención, se proporcionan mosquitos de la especie a *Anopheles* y esporozoitos de especie *Plasmodium* como se define en las reivindicaciones.

20 La presente invención permite preferentemente la producción aséptica de parásitos a través del uso de un entorno estéril que es capaz de soportar todas las fases del ciclo de vida del insecto-parásito. Los insectos se desarrollan en huevos con la superficie esterilizada y a los insectos en desarrollo se les proporciona aire filtrado, agua estéril y nutrición apropiada para el desarrollo estéril durante la metamorfosis de huevo a adulto. Después de alcanzar la madurez, a los insectos se les proporciona alimento estéril a base de sangre infecciosa que contiene la forma infecciosa del parásito que va a producirse.

25 También se divulga el aturdimiento de los insectos infecciosos, que permite la recogida eficaz de los insectos infectados inmóviles de una manera segura, que después pueden procesarse para la recogida de los parásitos.

Las especies parasitarias y de insectos hematófagos se definen en las reivindicaciones. Un ejemplo de un par parásito-mosquito es *Plasmodium falciparum-Anopheles stephensi*.

30 Por tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar parásitos como se define en las reivindicaciones de forma estéril, inocua y económica. Los parásitos asépticos de la presente invención son adecuados para el desarrollo de vacunas en seres humanos. Se describen aparatos y métodos para la producción de cepas de insectos (por ejemplo, mosquitos *Anopheles*) que tengan propiedades deseadas tales como hipoalergenicidad e hiperinfectividad. También se divulgan métodos de producción de una cepa de un parásito que sea capaz de resistir la criopreservación a temperaturas cercanas a la congelación. También se divulgan aparatos y métodos para la inyección de una vacuna parasitaria atenuada. La presente invención permite la producción de parásitos e insectos hematófagos como se define en las reivindicaciones que están libres de contaminación por agentes biológicos no deseados tales como bacterias y otros microorganismos. Los aparatos divulgados proporcionan la reconstrucción de ciclos de vida parasitarios complejos asépticamente, se modo que impiden la contaminación bien del parásito o insecto vector hospedador con agentes biológicos no deseados. La presente invención también proporciona una vacuna de esporozoitos de *Plasmodium* atenuada que es estable a temperaturas criogénicas relativamente superficiales. También se describen aparatos para la administración de cantidades de micro-bolos de vacuna.

Breve descripción de los dibujos

45 Para entender claramente la presente invención y llevarla la práctica de un modo fácil, la presente invención se describirá junto con las siguientes figuras, en las que los mismos caracteres de referencia designan los mismos o similares elementos, cuyas figuras se incorporan en y constituyen una parte de la memoria descriptiva, en la que:

50 la **Figura 1** es una vista externa de una cámara de producción de parásitos;
 la **Figura 2** es una vista superior del interior de una cámara de producción de parásitos que muestra los tubos de entrada y salida;
 la **Figura 3** es una vista superior del interior de una cámara de producción de parásitos que muestra los puertos y puntos de los accesos mecánicos;
 55 la **Figura 4** es una vista superior del interior de la parte de cría de insectos de una cámara de producción de parásitos;
 la **Figura 5** es una vista superior del interior de la parte de la alimentación con sangre de una cámara de producción de parásitos;
 la **Figura 6A** es una vista de una estación de alimentación de sangre;
 60 la **Figura 6B** es una vista de una estación de alimentación de sangre;
 la **Figura 7A** es una vista de un alimentador de azúcar mediante una mecha;
 la **Figura 7B** es una vista de un alimentador de azúcar mediante un comedero;
 la **Figura 8A** es una vista de una matriz de cámaras de picadura de insectos hematófagos;
 la **Figura 8B** es una vista inferior de una matriz de cámaras de picadura de insectos hematófagos;
 65 la **Figura 9A** es una vista de un ensamblaje de vacuna en micro-bolo; y
 la **Figura 9B** es una vista de un ensamblaje de vacuna en micro-bolo.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Se entenderá que las figuras y descripciones de la presente invención se han simplificado para ilustrar elementos que son relevantes para entender claramente la invención. La descripción detallada se proporcionará a continuación en el presente documento con referencia a los dibujos adjuntos.

Generalmente, se divulgan aparatos y métodos para la producción de parásitos en insectos hematófagos. La descripción respalda preferentemente esta producción en etapas múltiples - desde la selección de especies de insectos y parásitos con determinadas propiedades deseadas, para el desarrollo de parásitos asépticos para su uso en el desarrollo de una vacuna atenuada, hasta los sistemas de administración para la inyección de la vacuna atenuada. Los diversos aspectos y realizaciones de la presente invención pueden utilizarse conjuntamente o como componentes individuales en la producción y el suministro de una vacuna atenuada.

Un aspecto de la presente invención proporciona parásitos de animales vertebrados en fase del insecto, en insectos hematófagos como se define en las reivindicaciones, producidos en condiciones asépticas *in vivo*. Se contempla que estos parásitos asépticos e insectos hematófagos son útiles en la producción de vacunas protectoras y en investigación experimental.

Se divulga una cámara de producción de parásitos que está diseñada para impedir la contaminación microbiana del entorno interno en el que los insectos hematófagos y los parásitos se están desarrollando. Esto permite que la cámara de producción de parásitos se localice en un entorno externo no estéril durante la maduración del insecto y el parásito tal como una sala calentada con luz diurna. No se requiere que los operarios lleven prendas, máscaras, guantes o cubiertas protectoras para zapatos, lo que mejora significativamente la comodidad, eficacia y el gasto de operación. Adicionalmente, las cámaras de producción de parásitos preferentemente separan físicamente los mosquitos *Anopheles* infecciosos del operario impidiendo una picadura accidental que podría causarle una infección de malaria potencialmente peligrosa.

La presente invención proporciona la producción aséptica de insectos hematófagos y parásitos como se define en las reivindicaciones a través del establecimiento de un entorno estéril en el que se desarrollan los insectos y parásitos. La esterilidad de este entorno se mantiene preferentemente durante el ciclo de vida del parásito-insecto. Las cámaras y componentes internos de las cámaras de producción de parásitos son preferentemente estériles al inicio del procedimiento de desarrollo. Los huevos de los insectos con la superficie esterilizada se emplean cuando se desarrolla inicialmente la colonia del insecto. Además, la sangre de la que se alimentan los insectos hematófagos adultos, y que proporciona el parásito para el insecto, está también libre de contaminación microbiana. Además, el agua, caldo de cultivo de la larva, soluciones de alimentación y el resto de las soluciones y materiales que se usan en las cámaras de producción de parásitos de la presente invención también son estériles. Puede emplearse cualquiera de los medios convencionales para la esterilización incluyendo, sin limitación, autoclave, esterilización química, radiación y microfiltración. Los expertos en la técnica conocerán bien las técnicas de esterilización adicionales.

La cámara de producción de parásitos puede construirse de materiales resistentes a altas temperaturas tales como vidrio metálico o compuestos de plástico. La forma general puede ser rectangular o un cubo de dimensiones variables. El interior de una cámara de producción de parásitos alberga diversos componentes que mantienen las necesidades del ciclo de vida de fase de los insectos hospedadores del parásito y puede dividirse físicamente en secciones tal como lo estipule la pareja de parásito-insecto a producir.

Los diversos tubos de entrada y salida, puertos mecánicos, y depósitos de la cámara de producción de parásitos de la presente invención se describirán, después de describir los métodos y funcionamiento del aparato.

En la **FIG. 1** se presenta una vista anterior de una realización actualmente preferida de la presente invención **100**. Tres paredes laterales **104** están hechas con una disposición para ventanas de vidrio o plástico transparente **108** con cierres herméticos. El último lado **112** se equipa preferentemente con una escotilla que permite acceder al interior de la cámara para limpiar y preparar la producción de parásitos. El borde interno de la escotilla tiene preferentemente una junta de goma continua para proporcionar un cierre hermético a la pared lateral del aparato. Cierres de compresión **116** dispuestos en la periferia de la escotilla permiten que la junta de goma se apriete herméticamente contra la pared lateral. Lubricantes no volátiles, no tóxicos, tales como glicerol pueden revestir la junta de goma para mejorar el cierre hermético de la escotilla cuando se acoplan las escotillas previamente mencionadas. La parte superior de la cámara de producción de parásitos **120** es preferentemente de un material transparente tal como vidrio o plexiglás que puede reforzarse en su cara interna mediante una reja metálica. La parte superior transparente permite observar la parte interna de la cámara y permite que entre luz para una variación de la luz diurna, que puede ser necesaria para el desarrollo de numerosos insectos.

Varios tubos metálicos **124 128** se extiende desde el interior al exterior de la cámara de producción de parásitos. Cuando el tubo pasa a través de la pared de la cámara de producción de parásitos, una soldadura metálica o epoxi asegura el tubo y crea un cierre hermético. Los tubos permiten la transferencia de gases y líquidos estériles hacia el interior y el exterior del aparato. Los líquidos pueden introducirse bien en depósitos o en aparatos de alimentación

como se describe en el presente documento más adelante. Cada tubo tiene una finalidad distinta dependiendo de la especie de parásito y de la especie de insecto que se produzca. Además, cada tubo tiene preferentemente un filtro de micro-poro **132** acoplado a su extremo exterior para impedir la contaminación del interior de la cámara de producción de parásitos. La cámara de producción de parásitos de la presente invención también incluye preferentemente puertos de acceso operativos **136** que permiten el acceso físico al interior de la cámara de producción de parásitos.

La **FIG. 2** es una vista transversal del interior de un aparato divulgado en el presente documento, que muestra específicamente los tubos que se extienden hacia el interior de la cámara de producción de parásitos. El interior de la cámara de producción de parásitos puede dividirse en dos partes por una pared **205** que contiene preferentemente una puerta que puede cerrarse **206** entre las dos partes. Las dos partes de la cámara de producción de parásitos pueden concebirse como una parte de cría de insectos **200** y una parte de alimentación de sangre **202**. Un tubo de entrada de aire **204** permite forzar la entrada de aire humidificado en la cámara de producción de parásitos proporcionando de este modo oxígeno al sistema así como crear un gradiente de presión positiva desde el entorno interno al externo que inhibe la contaminación microbiana del sistema. El tubo de entrada de aire **204** también puede administrar gas anóxico al sistema para sacrificar a los insectos infectados por parásitos para una recogida fácil como se describirá en el presente documento a continuación. Un tubo de salida de aire **208** permite que forzar el aire para la ventilación desde el interior de la cámara de producción de parásitos. Tanto el tubo de entrada de aire **204** como el tubo de salida de aire **208** tienen preferentemente un filtro de micro-poro **205 209** unido a su extremo exterior para impedir que la contaminación microbiana transmitida por el aire pase desde el entorno externo al interior de la cámara de producción de parásitos.

La **FIG. 2** además describe un tubo **216** útil para la introducción de caldo de cría de larvas en la parte de cría de insectos **200** de la cámara de producción de parásitos. El tubo de introducción de caldo **216** también puede contener un filtro de micro-poro **217** para filtrar el caldo. El caldo de cría de larvas que se usa dentro del contexto de la presente invención puede ser caldo sintético o semi-sintético, según lo dicte el insecto particular que se está desarrollando. El tubo de introducción de caldo **216** permite que el caldo de cría de larvas se introduzca en el depósito de cría de larvas como se describe en el presente documento más adelante.

La **FIG. 2** presenta además un tubo **220** para la introducción de agua en un depósito de contención de huevos como se describe en el presente documento más adelante. El tubo de introducción de agua **220** contiene preferentemente un filtro de micro-poro **221** que permite que el agua se filtre de manera estéril antes de introducirse en el depósito de contención de huevos.

La **FIG. 2** también divulga un tubo de calentamiento de sangre **224**. Ambos extremos del tubo de calentamiento de sangre **224** se extienden preferentemente desde el exterior de la cámara de producción de parásitos y ambos extremos están abiertos al entorno externo. El tubo de calentamiento de sangre **224** sirve como una espiral de calentamiento de agua caliente para atraer a los mosquitos hembra adultos a la parte de la alimentación de sangre **202** de la cámara de producción de parásitos y calentar el alimento a base de sangre infecciosa como se describe más adelante en el presente documento. La **FIG. 2** describe además un tubo de introducción de sangre **228** que actúa como un conducto para que la sangre infecciosa se desplace en el interior de la parte de alimentación de sangre **202** del aparato para que los insectos la consuman. El extremo exterior del tubo de introducción de sangre **228** está preferentemente cerrado por un tapón hermético de látex o de goma **232**. El tapón de látex o de goma **232** en el extremo exterior del tubo de introducción de sangre **228** permite inyectar asépticamente un alimento a base de sangre infecciosa a través del tapón **232** mediante una aguja unida a una jeringa.

Las paredes externas de una cámara de producción de parásitos actualmente preferida incluyen una serie de puertos y puntos de acceso físicos como se muestra en la **FIG. 3**. Cada puerto se cierra preferentemente mediante una escotilla estrechamente ajustada, una junta, y un cierre para proporcionar un cierre hermético al interior de la cámara de producción de parásitos. En otra realización preferida, los puertos podrían diseñarse con un tapón de goma o látex estrechamente ajustado como se ha descrito anteriormente. Para mejorar el cierre hermético, la junta puede recubrirse con un lubricante no volátil y no tóxico tal como glicerol. Cada puerto se diseña y localiza para servir a un propósito específico en la producción de parásitos y por tanto su diámetro puede variar de acuerdo con las necesidades del insecto que se está desarrollando. Un puerto de transferencia de huevos **304** preferentemente se abre en la parte de cría de insectos **302** de la cámara de producción de parásitos. El puerto de transferencia de huevos **304** permite preferentemente que los huevos con la superficie esterilizada se transfieran por medio de una pipeta estéril sobre un flotador semi-sumergible en el depósito de cría de larvas como se describe a continuación en el presente documento. Un puerto de retirada de insectos **308** preferentemente abierto a la parte del alimento a base de sangre **300** de la cámara de producción de parásitos. El puerto de retirada de insectos **308** permite preferentemente recoger los insectos infectados después de que se hayan sacrificado al final del proceso de producción.

Internamente, la cámara de producción de parásitos de la presente invención está preferentemente subdividida en una parte de cría de insectos **302** y una parte de alimentación de sangre **300** mediante una separación **312**, que puede ser una pared sólida o un filtro de malla. La separación **312** tiene preferentemente una puerta **316** entre la parte de cría de insectos **302** y la parte de alimentación con sangre **300** que puede abrirse o cerrarse mediante una

varilla de unión mecánica **320**. Este dispositivo también puede ser un tornillo de rosca o cualquier otro dispositivo mecánico usado para abrir y cerrar la puerta **316**. La varilla de unión mecánica **320** se acciona preferentemente manipulando una palanca **324** en la superficie externa de la cámara de producción de parásitos. La varilla de unión mecánica **320** está preferentemente encerrada en un ojal metálico o de goma estrechamente ajustado **328** lubricado con un lubricante no volátil y no tóxico tal como glicerol en el que la varilla de unión mecánica **320** pasa a través de la pared externa en el interior del aparato. Este ojal **328** ayuda a mantener la esterilidad dentro de la cámara de producción de parásitos.

Como se muestra en la **FIG. 4**, la parte de cría de insectos **402** de la cámara de producción de parásitos contiene múltiples componentes especializados que son capaces de soportar las fases de vida acuática asépticas de los huevos, larvas, pupas y adultas de los insectos. Un depósito de cría de larvas **406** descansa sobre la parte inferior del aparato y está diseñado para contener el caldo de cría de larvas suministrado por el tubo de introducción de caldo **410** como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Un flotador semi- sumergible **414** descansa preferentemente sobre la parte inferior del depósito de cría de larvas **406**. Cuando el caldo de cría de larvas llena parcialmente el depósito de cría de larvas **406**, el flotador semi-sumergible **414** descansa justo por debajo de la superficie del líquido. Los huevos con la superficie esterilizada de mosquitos *Anopheles* ya no flotan y morirán si se sumergen demasiado profundamente en el caldo de cultivo de larvas. El flotador semi-sumergible **414** mantiene preferentemente los huevos con la superficie esterilizada justo por debajo de la superficie del fluido garantizando la viabilidad. Dado que el flotador **414** es semi-sumergible, no se impide que las larvas L1 puedan nadar a otras localizaciones dentro del depósito de cría de larvas **406**. La parte de crías de insectos **402** del aparato también contiene un depósito de alimentación de azúcar **418**. El depósito de alimentación de azúcar **418** es preferentemente un pequeño comedero de azúcar con una almohadilla de aterrizaje de filtro de malla que proporciona a los insectos adultos una sustancia nutritiva después de la eclosión de las pupas. Como alternativa, el depósito de alimentación de azúcar puede ser un sistema de alimentación de azúcar mediante una mecha como se describe en el presente documento más adelante. Dado que el azúcar es altamente hidrófilo y se disuelve parcialmente en condiciones de alta humedad y en temperaturas cálidas, la almohadilla de aterrizaje permite que los insectos adultos aterricen y se alimenten del azúcar a través de la malla sin quedar adheridos.

La parte de alimentación de sangre **502** de la cámara de producción de parásitos se representa en la **FIG. 5**. Dentro de la parte de alimentación de sangre **502**, los componentes especializados mantienen la producción de parásitos asépticos y de huéspedes de insectos, es decir, esporozoitos de especies de *Plasmodium* dentro del mosquito hembra adulto. Una estación de alimentación de sangre **506** está constituida por un depósito de sangre **510** cubierto por una fina membrana o filtro de malla fina como se describe con detalle más adelante. El depósito de sangre **510** puede ser un alimentador de tipo Rutledge o cualquier otro tipo de dispositivo de alimentación de sangre. El depósito de sangre **510** está conectado al tubo de introducción de sangre **514** que se extiende hacia el exterior de la cámara de producción de parásitos. Como se ha descrito anteriormente, el tubo de calentamiento de sangre **522** es una espiral de calentamiento que hace circular el agua caliente hacia el interior y fuera del aparato. La espiral del tubo de calentamiento de sangre **522** circunda preferentemente el depósito de sangre **510** o hace circular el agua caliente dentro de un alimentador de tipo Rutledge para calentar la sangre. La presente invención se utiliza para producir esporozoitos de *Plasmodium* y mosquitos *Anopheles*, y la operación del depósito de sangre **510** puede funcionar para separar mosquitos hembra de machos y proporciona también un alimento a base de sangre infecciosa para los mosquitos hembra para el desarrollo propagativo del ciclo de parásitos de especies de *Plasmodium*.

La **FIG. 5** describe adicionalmente un depósito de alimentación de azúcar **526** que es similar al depósito de alimentación de azúcar encontrado en la parte de cría de insectos de la cámara de producción de parásitos. Aunque este aspecto de la presente invención se describe usando azúcar como ejemplo, puede usarse cualquier fuente nutritiva. El depósito de alimentación de azúcar **526** es preferentemente un comedero pequeño de azúcar con una almohadilla de aterrizaje de filtro de malla que proporciona a los insectos adultos una sustancia nutritiva. El depósito de alimentación de azúcar **526** puede reemplazarse por un sistema de alimentación mediante una mecha como se describe en el presente documento a continuación.

Después de una alimentación de sangre, los mosquitos *Anopheles* hembra desarrollarán sus huevos en aproximadamente 48 horas. Para permitir el ovi-posicionamiento de estos huevos, un depósito de ovi-posición de huevos **530** descansa en la parte inferior de la parte de alimento a base de sangre de la cámara de producción de parásitos. El depósito de ovi-posición de huevos **530** se diseña para estar parcialmente lleno con agua estéril suministrada por el tubo de introducción de agua **534**.

La **FIG. 6** representa dos realizaciones preferidas de una estación de alimentación de sangre. La **FIG. 6A** representa el tubo de sangre caliente **602** que permite que el agua caliente se transfiera desde el exterior hacia el interior de la cámara de producción de parásitos para calentar el alimento a base de sangre infecciosa. El agua caliente se transfiere después de nuevo a la cámara de producción de parásitos mediante otro tubo **601**. El tubo de calentamiento de sangre **602** se expande hacia el interior de una cámara **603** que rodea una cámara de alimentación de sangre **606**. El tubo de introducción de sangre **610** se extiende hacia el exterior del aparato. El extremo exterior del tubo de introducción de sangre **610** contiene un tapón de látex o de goma **614**. Durante la operación de la estación de alimentación de sangre, la sangre infecciosa se inyecta a través del tapón **614** en el tubo de introducción de sangre **610**. La sangre se desplaza hacia abajo del tubo de introducción de sangre **610** hacia el interior de la

cámara de alimentación **606** donde se dispersa sobre la membrana **622** que se alinea con la parte inferior de la cámara de alimentación de sangre **606**. La membrana **622** es tal que la probóscide de un mosquito hembra adulto la puede perforar, proporcionando de este modo un alimento a base de sangre infecciosa al mosquito. Durante el calentamiento de la sangre, el volumen de gas dentro de la cámara de alimentación de sangre **606** se expande. Durante la esterilización térmica de la cámara de alimentación de sangre **606** el volumen de gas en el interior de la cámara de alimentación de sangre **606** se expande. Para no dañar ni la membrana **622** ni el tapón **614**, se incluye un respiradero **618** en el aspecto superior del tubo de introducción de sangre **610** que permite mitigar cualquier elevación de presión.

Otra realización de una estación de alimentación de sangre se describe en la **FIG. 6B**. Los tubos de calentamiento de la sangre **626** se extienden desde el exterior hacia el interior de la cámara de producción de parásitos. En esta realización, los tubos de calentamiento de sangre **626** se ponen en contacto con un depósito de sangre **634** de tal manera que cuando la sangre caliente se bombea a través de los tubos de calentamiento de sangre **626**, la sangre dentro del depósito de sangre **634** se calienta. Existen diversas maneras de conseguir este calentamiento, incluyendo los tubos de calentamiento de sangre **626** que circundan el depósito de sangre **6341**, los tubos de calentamiento de sangre **626** establecen contacto por debajo del depósito de sangre **6341** y los tubos de calentamiento de sangre **626** forman un depósito de calentamiento **630** yuxtapuesto al depósito de sangre **634**. Un experto en la técnica reconocería numerosas formas de calentar el alimento a base de sangre. La sangre tiene una membrana o malla **638** en la parte superior de la misma para proporcionar insectos adultos (por ejemplo, hembras adultas de mosquitos *Anopheles*) sosteniéndoles cuando toman un alimento a base de sangre infecciosa. La sangre infecciosa puede inyectarse en el tubo de introducción de sangre **642** a través de un tapón de goma o látex **646** localizado en el extremo exterior del tubo de introducción de sangre **642**. El tubo de introducción de sangre **642** también puede contener un respiradero **650** que puede usarse para liberar la presión que puede subir durante la esterilización con autoclave.

La **FIG. 7A** describe un alimentador de azúcar mediante una mecha **700** para el uso dentro del aparato. El alimentador de azúcar se mantiene preferentemente en la parte superior del aparato de la presente invención **704**. La parte inferior del alimentador de azúcar **700** se extiende preferentemente hacia el interior del aparato de la presente invención con un cierre hermético. La parte superior del alimentador de azúcar **700** contiene preferentemente un tapón de goma o látex **708** a través del cual se inyecta la solución de azúcar **716** en un depósito **712** en el alimentador de azúcar **700**. La solución de azúcar **716** drena hacia la parte inferior del depósito **712** en una mecha **720** que se extiende hacia el interior del aparato. Después los insectos pueden aterrizar sobre la mecha **720** y consumir la solución azucarada **716** que satura la mecha **720**.

La **FIG. 7B** describe un alimentador de azúcar mediante un comedero **724** para usar con el aparato. El azúcar **728** se coloca preferentemente en la base del comedero **732** con una membrana de filtro **736** sobre la parte superior que actúa como una almohadilla de aterrizaje. Dado que el azúcar **728** es muy hidrófilo y se disuelve parcialmente en condiciones de alta humedad y temperatura cálida, la membrana de filtro **736** permite que los insectos adultos aterricen y se alimenten del azúcar **728** a través de la membrana sin quedar pegados.

Para adaptar la cámara de producción de parásitos de diversos pares parásito/insecto como se define en las reivindicaciones, se pueden añadir comederos, tubos adicionales, depósitos, puertos y subsecciones no descritos específicamente. Si se desea, los depósitos pueden drenarse con tubos adicionales después de haberse completado la función del depósito.

La operación de la cámara de producción de parásitos descrita anteriormente para la producción aséptica de esporozoitos de *Plasmodium* y mosquitos *Anopheles* se describirá ahora. Inicialmente, toda la cámara de producción de parásitos está esterilizada bien por radiación, tratamiento químico, con autoclave u otros procesos de esterilización conocidos en la técnica y la esterilidad se mantiene después de esto. Los diversos depósitos de alimentación de azúcar se llenan de azúcar. La puerta entre la parte de cría de insectos de la cámara de producción de parásitos y la parte de alimentación de sangre de la cámara de producción de parásitos se cierra para limitar el movimiento inicial de los mosquitos inmaduros.

El depósito de cría de larvas se llena parcialmente con un caldo de cría de larvas estéril a través del tubo de introducción de caldo de larvas y el flotador semi-sumergible comenzará a descansar justo por debajo de la superficie del caldo. Los huevos de *Anopheles* con la superficie esterilizada se colocan después sobre el flotador semi-sumergible a través del puerto de acceso de huevos. La temperatura y la humedad del interior de la cámara de producción de parásitos se mantienen a condiciones que promueven el desarrollo de los huevos de *Anopheles*. Dado que los huevos se desarrollan en larvas, las larvas nadan fuera del flotador y alrededor del depósito de cría de larvas.

[1] Después del desarrollo de las larvas en pupas, los adultos eclosionan de las pupas y vuelan libremente alrededor del interior de la parte de cría de insectos del aparato alimentándose del azúcar que se localiza en el depósito de alimentación de azúcar. Después de que los mosquitos se han desarrollado en adultos, los mosquitos hembra están listos para alimentarse de un alimento a base de sangre infecciosa de gametocitos en la parte de alimentación de sangre de la cámara productora de parásitos.

Para comenzar con el procedimiento de alimentación de sangre, se fuerza que el agua caliente pase a través de la entrada de un tubo de calentamiento de sangre que forma una espiral alrededor y a través del depósito de alimentación de sangre. La puerta en la división que separa la parte de cría de insectos y la parte de alimentación de sangre de la cámara de producción de parásitos se abre mediante una palanca. Los mosquitos hembra de *Anopheles* se atraen selectivamente a la fuente de calor y vuelan a través de la escotilla, separándose eficazmente los mosquitos hembra de los machos. Tras un periodo de tiempo, la escotilla se cierra después. La sangre infecciosa que contiene gametocitos del parásito *Plasmodium* se inyecta a través del puerto de látex o goma exterior del tubo de introducción de sangre. La sangre fluye hacia abajo del tubo de introducción de sangre y se dispersa sobre la membrana o debajo del tapiz del filtro de malla dependiendo del sistema de alimentación de sangre que se esté empleando. Los mosquitos hembra *Anopheles* después se alimentan de sangre infecciosa de gametocitos.

Después de un periodo de tiempo suficiente para el desarrollo de los esporozoitos, el gas anóxico filtrado de manera estéril se hace pasar dentro del aparato desde el tubo de entrada de aire. Esto aturde a los mosquitos y caen a la parte inferior del aparato. El puerto de retirada de insectos se abre y un tubo de vacío estéril se inserta y los mosquitos hembra se retiran asépticamente de la parte de alimentación de sangre de la cámara de producción de parásitos. Estos mosquitos hembra son entonces una fuente de esporozoitos asépticos de *Plasmodium*.

La operación de la cámara de producción de parásitos de la presente invención puede entenderse mejor con la descripción del siguiente ejemplo.

Ejemplo

Los depósitos de alimentación de azúcar se cargan con una cantidad pequeña de sacarosa. Varios mililitros de una suspensión fina de solución particulada adecuada para la ingestión por larvas *Anopheles* se mezclan con 300 mililitros de agua y se colocan en el depósito de cría de larvas del sistema. La puerta entre la parte de cría de insectos y la parte de alimentación de sangre se cierra y el recipiente se esteriliza con autoclave a 120 grados Celsius a 193,55 gramos por centímetro cuadrado de presión durante 30 minutos. El dispositivo se deja enfriar lentamente a temperatura ambiente. El caldo de cría de larvas semi-sintético se filtra después por esterilización en el depósito de cría de larvas para reemplazar o volverlo a llenar de nutrientes termolábiles.

Aproximadamente 100 huevos de *Anopheles stephensi* cuya superficie se ha esterilizado agitando durante 10 minutos en etanol al 70 por ciento y en cloruro de benzalconio al 1 por ciento y se han lavado, se transfieren en el sistema con una pipeta usando una técnica estéril mediante un puerto de transferencia huevos. Los huevos con la superficie esterilizada, que ya no flotan, se descargan sobre un flotador semi-sumergible. El aparato se transfiere a una sala con una temperatura de 28 grados Celsius y una fase de luz diurna de luz:oscuridad 14/10. El aire de bajo volumen se filtra de manera estéril en el aparato para mantener un gradiente de presión positivo en el interior del sistema.

Los huevos eclosionan y larvas y las pupas se forman en el depósito de cría de larvas con la aparición de mosquitos adultos aproximadamente en 9 días. La nutrición de los mosquitos adultos deriva de una fuente o fuentes de azúcar estéril o estériles en el dispositivo.

La puerta entre la parte de cría de insectos y la parte de alimentación con sangre del aparato se abre posteriormente aproximadamente tres días después de que emerjan de las pupas. Una estación de alimentación caliente en la parte de alimentación de sangre del aparato induce que los mosquitos hembra adultos se separen por sí mismos de los machos volando a través de la puerta abierta en busca de un alimento a base de sangre obligado. Los machos no se ven atraídos por la fuente de calor y no buscan alimentarse de sangre. Después de una cantidad de tiempo suficiente para la separación de hembras y machos, se cierra la escotilla.

Después de alimentarse sobre un alimento a base de sangre infecciosa de gametocitos de *Plasmodium*; a las hembras de mosquito grávidas infectadas, se les proporciona agua estéril para la puesta de los huevos y la nutrición procede de una fuente de azúcar estéril. Los esporozoitos de *Plasmodium* se desarrollan completamente en el mosquito *Anopheles* hembra aproximadamente 14 días después de la alimentación con sangre infecciosa. En este momento, el gas anóxico micro-filtrado se descarga en el aparato, aturdiendo de esta manera a los mosquitos. Los mosquitos hembra aturdidos se retiran entonces mediante un puerto de retirada de insectos y se procesan para obtener los esporozoitos de *Plasmodium* asépticos, que pueden usarse en el desarrollo de, y en el inmunógeno de, una vacuna de esporozoitos atenuada completa.

También se divulga una disposición de cámara de picaduras de insectos hematófagos (**FIG. 8A, 8B**). Este aparato es útil para el estudio del comportamiento de la picadura y potencial reactogénico/alergénico de insectos hematófagos individuales. Estos estudios son útiles en el cultivo selectivo y manipulación genética de poblaciones de insectos hematófagos.

La matriz de la cámara de picadura de insectos hematófagos es preferentemente una estructura rectangular tridimensional con dos grandes superficies paralelas planas de forma rectangular. El interior de la matriz de la cámara de picadura de insectos hematófagos **800** se subdivide preferentemente en sub-cámaras múltiples **804** de

dimensiones similares. Cada subcámara se extiende a ocho de las matrices y es capaz de alojar un insecto individual.

5 En un lado de la matriz, la superficie es una malla metálica **808** que impide el escape de las especies de insectos bajo estudio. Se dispone una cubierta de plástico de tal manera que la malla **808** puede cubrirse para impedir que los insectos piquen inadvertidamente al operario o que tengan corrientes de aire que alteren el entorno interno de las subcámaras **804**. La malla **808** permite de este modo que los insectos investiguen, piquen o se alimenten sobre la piel de un ser humano o animal cuando el insecto hematófago pique la matriz de la cámara **800** que está yuxtapuesta a un parche de la piel. La malla **808** está unida preferentemente y sujeta por el perímetro externo sólido de la matriz de la cámara de picadura de un insecto hematófago y el perímetro interno sólido de las subcámaras.

15 En un lado de la matriz opuesto al de la malla **808**, se unen escotillas individuales **812** al perímetro externo de cada subcámara **804** de modo que permiten el acceso a cada subcámara **804** individualmente. Las subcámaras **804** permiten de este modo que los insectos individuales se alojen por separado. En dicha disposición, cada insecto no está sometido a interferencia con otros insectos y variables del entorno tales como exposición a luz, color del entorno, entorno químico, etc. pueden manipularse independientemente para cada insecto.

20 Para operar la matriz de la cámara de picadura de insecto hematófago **800**, los insectos individuales se colocan en las subcámaras **804** y las escotillas **812** se aseguran. El recubrimiento de plástico que está sobre la malla **808** se retira y el lado de la malla **808** de la matriz se pone en contacto con la piel de un ser humano u otro animal. Usando un protocolo que puede desarrollarse particularmente para cada especie de insecto a ensayar, se permite que los insectos investiguen y se alimenten durante tiempos variables. La estructura de la matriz de la cámara de picadura de insecto hematófago **800** es de tal manera que permite que el mismo parche de piel se exponga al mismo insecto múltiples veces.

25 También se divulga una cepa de insectos, tales como mosquitos, que es hipoalérgica para los seres humanos u otros animales.

30 La producción de insectos hipoalérgicos puede realizarse mediante el siguiente procedimiento. A una población diversa genéticamente heterogénea de una especie de mosquito particular se le permite que reproduzca libremente en un insectario cerrado. Las hembras grávidas se aíslan en un momento apropiado de su ciclo de vida cuando necesitan alimento a base de sangre para completar el desarrollo de los huevos.

35 Una serie de hembras de mosquito de este tipo se colocan preferentemente después en contenedores rectangulares subdivididos que están adaptados para permitir el acceso a los mosquitos a la piel de un ser humano u otro animal al mientras que mismo tiempo no se les permite abandonar la cámara. Un ejemplo de este aparato es la matriz de la cámara de picadura de insecto hematófago descrita anteriormente en el presente documento. Preferentemente, un solo mosquito hembra ocupa cada cámara de la matriz de la cámara de picadura de insecto hematófago.

40 La matriz de la cámara de picadura de insecto hematófago se mantiene preferentemente bajo controles estrictos del entorno de tal manera que tiene una variabilidad limitada de temperatura, humedad y luz ambiental.

45 Una matriz de la cámara de picadura de insecto hematófago que se carga con mosquitos hembra se coloca después sobre la superficie de la piel de un ser humano o animal previamente preparada. Preferentemente, a cada mosquito hembra se le permite el libre acceso a una sola sección única de la piel. La preparación de la piel puede incluir el rasurar el pelo de la piel de la localización de ensayo y la limitación de la exposición de la superficie de la piel a jabones, cremas u otras sustancias artificiales durante aproximadamente 24-48 horas. La superficie de la piel se marca preferentemente de tal manera que el investigador puede identificar qué mosquito hembra ha picado a cada sección de piel.

50 Los sujetos y los animales de ensayo incluyen preferentemente tanto individuos que reaccionan normalmente a las picaduras de mosquito como aquellos que tienen un historial de hipersensibilidad a las picaduras de mosquitos.

55 La matriz de la cámara de picadura de insecto hematófago se coloca preferentemente sobre la piel durante un corto periodo de tiempo lo que permite que los mosquitos investiguen la piel en un esfuerzo para obtener un alimento a base de sangre. La matriz de la cámara de picadura de insecto hematófago se levanta después de la piel de dos a tres veces y después se vuelve a poner en el mismo punto de la piel. Esto permite preferentemente que los mosquitos investiguen adicionalmente y por tanto inyecten más antígenos en el mismo parche de la piel. Aquellos mosquitos hembra que no investigan ni se hinchan, se identifican y se desechan. Cada exposición de la matriz de la cámara de picadura de insecto hematófago puede durar aproximadamente dos periodos de alimentación secuenciales de tres minutos por un descanso de un minuto.

65 Después de que la exposición de la matriz de la cámara de picadura de insecto hematófago se haya completado, la reacción de la piel del ensayo en el ser humano o animal se evalúa, a los quince minutos, treinta minutos, una hora, dos horas, veinticuatro horas y cuatro días. Dichos periodos de tiempo permiten evaluar las reacciones de hipersensibilidad, de Arthus y de hipersensibilidad de tipo retrasado. La evaluación incluirá medición objetiva

cuidadosa de eritema, endurecimiento y tamaño de la lesión de cada mosquito en un tiempo cuestión. Las mediciones subjetivas se realizan también preferentemente para valorar el prurito en los sitios de picadura.

5 Cada mosquito hembra en una cohorte de exposición a la matriz de la cámara de picadura de insecto hematófago que también mostró que investigó la piel y se hinchó en un alimento a base de sangre se evaluó con respecto al desarrollo reacciones de hipersensibilidad, reacciones de Arthus e hipersensibilidad tipo retardada en el sujeto de ensayo. Aquellas hembras con menor reactividad se devolvieron a una cámara de cría y se les permitió que pusieran los huevos. Aquellas que tenían una mayor reactividad se descartaron.

10 A los huevos de mosquitos hembra con una baja reactividad se les permitió eclosionar y desarrollarse. Partes de esta progenie se volvieron a criar entre sí o se permitió la cría aleatoria con la progenie de otra hembra con baja reactividad. Determinados huevos o larvas se criopreservaron para su uso en un tiempo posterior.

15 A los tiempos determinados por el investigador, se infectan las hembras con una baja reactividad y su progenie con los patógenos transmitidos por el insecto seleccionados de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, y *Plasmodium ovale* para garantizar que conservan la capacidad de propagar el patógeno de interés.

20 El procedimiento descrito anteriormente se repite preferentemente múltiples veces. El resultado de este procedimiento es el desarrollo de una cepa hipoalérgica de mosquitos que se muestra que tiene una baja o ninguna reactividad en animales y en seres humanos, al mismo tiempo que conserva la capacidad de propagar el patógeno de interés. Esta cepa de mosquito preferentemente será útil en el desarrollo de vacunas derivadas de los patógenos extraídos del cuerpo completo o saliva de los mosquitos de esa cepa.

25 También se divulgan métodos para la cría de una cepa de insectos capaces de tener una habilidad potenciada para soportar parásitos en fase infecciosa.

30 La producción de una cepa de mosquitos *Anopheles* que es capaz de soportar cargas más elevadas de esporozoitos de *Plasmodium* puede realizarse mediante el siguiente procedimiento. Las cepas heterogéneas o cepas homogéneas de mosquitos *Anopheles* se dividen en cohortes de hembras solas y algunas de las múltiples de machos. Cada cohorte se coloca preferentemente en un contenedor cerrado en el que se controla y se monitorizan las condiciones del entorno. Preferentemente, las condiciones entre los contenedores son coherentes.

35 Después se deja que los mosquitos críen. En el momento apropiado en el ciclo de vida, a las hembras se les ofrece un alimento a base de sangre de un conjunto de sangre infectada de *Plasmodium* que contiene bien gametocitos o sangre procesada que contiene oocinetos. La duración de la alimentación y otras variables se controla para garantizar la uniformidad en el entorno durante los procesos de alimentación con sangre. Los mosquitos hembra de los que se observa que no se alimentan ni se hinchan con la sangre infectada preferentemente se descartan.

40 En el momento apropiado en el ciclo de vida del mosquito, se añade un caldo acuoso con nutrientes a la parte inferior de cada contenedor. Los mosquitos hembra se monitorizan con respecto a la puesta de huevos. Preferentemente se descartan las hembras en las que no se observa puesta de huevos.

45 Algunos huevos o larvas en desarrollo se subdividieron y criopreservaron para uso posterior en los casos en los que las características individuales en su perfil físico y/o fisiológico materno podrían considerarse beneficiosos. Preservando alguna proporción de progenie en el almacenamiento en frío, la robustez genética y el potencial se mantienen.

50 Se permite que todos o alguna parte de los huevos y larvas de cada contenedor se desarrollen preferentemente. Si se observan anomalías en alguna proporción de los huevos o larvas, aquellas hembras y su progenie preferentemente se descartan.

55 En el tiempo apropiado en el ciclo de vida del esporozoito (aproximadamente de catorce a dieciséis días), las glándulas salivares del mosquito se diseccionan de la cabeza del mosquito. Las glándulas salivares se trituran delicadamente y se mezclan en una suspensión. Se añade una cantidad exacta de la suspensión a un volumen exacto de solución. La suspensión diluida se transfiere a un portaobjetos y se examina al microscopio. El nivel de infección se gradúa inicialmente como grado 1, 2, 3, o 4 usando metodología convencional. Dado que las poblaciones de mosquitos se seleccionan progresivamente, el número de esporozoitos se contará preferentemente.

60 Se evalúan otros factores relacionados con la morfología y genética para correlacionar la producción de esporozoitos con un atributo o atributos particulares. Estos factores incluyen, pero sin limitación, el tamaño de las glándulas salivares, longitud y tamaño del intestino medio, proteínas específicas y marcadores genéticos. Dichos factores se usarán en el desarrollo progresivo de la cepa del mosquito.

65 Un sistema de puntuación compuesto preferentemente usado para determinar un rango de cada mosquito hembra o su capacidad global para mantener un alto nivel de infección por *Plasmodium* al mismo tiempo que se completan satisfactoriamente aquellas acciones necesarias para mantener un ciclo de vida del parásito y mosquito progresivo.

Aquellas hembras con una puntuación compuesta alta tendrán su progenie conservada durante más ciclos de este proceso. La progenie seleccionada se criará por autogamia y por cría cruzada para seleccionar de manera estable la tolerancia a infección de esporozoitos.

5 A través de ciclos continuos, se crea una cepa de *Anopheles* genéticamente distinta altamente refinada capaz de niveles extremadamente altos de infección de *Plasmodium* y producción de esporozoitos. Dicha una cepa de *Anopheles* preferentemente conduce a una producción más eficaz de células completas de esporozoitos viables para su uso en una vacuna parásita muerta o viva atenuada.

10 También se divulga un aparato para inyectar volúmenes ultra-bajos de vacuna adecuados para acoplarse a jeringas convencionales.

Se divulga un aparato que se denominará ensamblaje de vacuna en micro-bolo (**FIG. 9A 9B**). El ensamblaje de vacuna de micro-bolo usa preferentemente micro-agujas **904** con múltiples micro-poros **908**. Los micro-poros **908** suministran el volumen total de la vacuna en los cientos o miles de mini-bolos. Las agujas **904** están acopladas a un depósito de plástico **912** que toma un volumen exacto de la vacuna de esporozoitos. El volumen de vacuna necesario se calcula multiplicando el número de agujas **904** por el volumen deseado de los mini-bolos más el volumen de las micro-agujas internas. La cobertura del depósito **912** en el lado opuesto de las agujas **904** es una placa elástica **916** que sella completamente el depósito **912**. Una estructura de plástico **920** con las mismas dimensiones externas que las del depósito de la vacuna **912**, se acopla después. Esta estructura de plástico **920** tiene un puerto de acoplamiento para hembras convencional **924** que se acopla al puerto de bloqueo convencional industrial de jeringas comunes **928**.

El ensamblaje de vacuna en micro-bolo **900** se opera de la siguiente manera. De uno a dos mililitros de gas atmosférico se introduce en una jeringa **932** y el ensamblaje de vacuna en micro-bolo **900** se acopla a la jeringa **932**. Las agujas **904** se colocan en la piel de los pacientes y el émbolo **936** de la jeringa se introduce a la fuerza. El gas dentro de la jeringa **932** se comprime y se desplaza hacia el interior del ensamblaje de la vacuna de en micro-bolo **900**. Después, el gas deforma la membrana elástica **916**. La membrana **916** empuja la solución de vacuna en el depósito de ensamblaje de vacuna en micro-bolo **912**. La vacuna se extruye en micro-bolos a través de los micro-poros **908** en los tejidos cutáneos. La membrana elástica **916** impide que el gas en la jeringa **932** pase al depósito de la vacuna **912** en el ensamblaje de la vacuna en micro-bolo **900**.

También se divulga un método para el desarrollo de una especie de esporozoitos de *Plasmodium* resistente al criopreservación/congelación.

Una especie de *Plasmodium* a alta temperatura criopreservable puede desarrollarse empleando el siguiente procedimiento. Cepas heterogéneas o una cepa homogénea de gametocitos/oocinetos de especies de *Plasmodium* se mezclan en un cultivo de sangre y se alimenta a mosquitos *Anopheles*. Los oocinetos se clasifican aleatoriamente y forman cigotos dentro del intestino medio de los mosquitos de la hembra.

A los parásitos de *Plasmodium* se les permite desarrollarse en esporozoitos. Setenta y dos horas antes de la extracción de los esporozoitos de los mosquitos, los mosquitos se someten a intervalos de cuatro a seis horas de temperaturas que disminuyen lentamente que se nivelan por encima de su nivel de tolerancia de supervivencia y después se permite que suban de nuevo hasta temperaturas iniciales. Esto activa los mecanismos celulares que producen proteínas estabilizantes, enzimas y azúcares complejos que ceban los esporozoitos para que resistan la crioconservación.

Después se extraen y se purifican los esporozoitos preferentemente del extracto del cuerpo entero del mosquito o glándulas salivares de acuerdo con las técnicas bien conocidas por los expertos en la materia.

Después los esporozoitos se criopreservan preferentemente a temperaturas de menos sesenta grados a cero grados Celsius en incrementos de diez a veinte grados en medios seleccionados adecuados para la inmunización directa en seres humanos. Las partes de estos esporozoitos se congelan *in vitro* y se evalúa su movilidad y otros marcadores de viabilidad.

Después los esporozoitos se descongelan preferentemente y se inyectan en seres humanos o animales. Una vez que el ser humano o animal comienza a ser parasitético, se extrae una muestra de sangre y se coloca en el cultivo de sangre. El ciclo de cultivo, infección y congelamiento se repite varias veces.

Los esporozoitos que sobreviven a la crioconservación de manera exitosa y demuestran la capacidad de completar su ciclo de vida completo tanto en el mosquito como en el ser humano o en el hospedador animal se seleccionará secuencialmente y se criarán entre sí y se volverán a criar con otras cepas exitosas para producir finalmente una cepa muy infecciosa tolerante a la temperatura de criopreservación alta del parásito *Plasmodium*.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Mosquitos *Anopheles* libres de contaminación con microorganismos, desarrollados en un entorno estéril, en donde los mosquitos se desarrollan a partir de huevos con la superficie esterilizada y se les proporciona aire filtrado, agua estéril y una nutrición estéril apropiada para la etapa de desarrollo durante la metamorfosis de huevo a adulto,
10 en donde dichos mosquitos, después de haber alcanzado la madurez, se infectan con parásitos *Plasmodium*, en donde la infección es el resultado de la alimentación de los mosquitos con un alimento estéril a base de sangre de gametocitos infecciosos procedente de una estación de alimentación de alimento a base de sangre;
15 en donde dichos parásitos se seleccionan del grupo que consiste en *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, y *R. malariae*, y en donde los esporozoitos de *Plasmodium* pueden obtenerse a partir de los mosquitos y en donde dichos esporozoitos de *Plasmodium* son adecuados para la producción de una vacuna para su uso en seres humanos.
2. Esporozoitos de *Plasmodium*, libres de contaminación con microorganismos, que pueden obtenerse o que se obtienen a partir de los mosquitos de la reivindicación 1.
3. Los esporozoitos de *Plasmodium* de la reivindicación 2, en los que dicha especie de *Plasmodium* es *P. falciparum*.
- 20 4. Una vacuna humana preparada utilizando los esporozoitos de *Plasmodium* de la reivindicación 2.
5. La vacuna humana de la reivindicación 4, que es una vacuna atenuada a base de esporozoitos de *Plasmodium*.

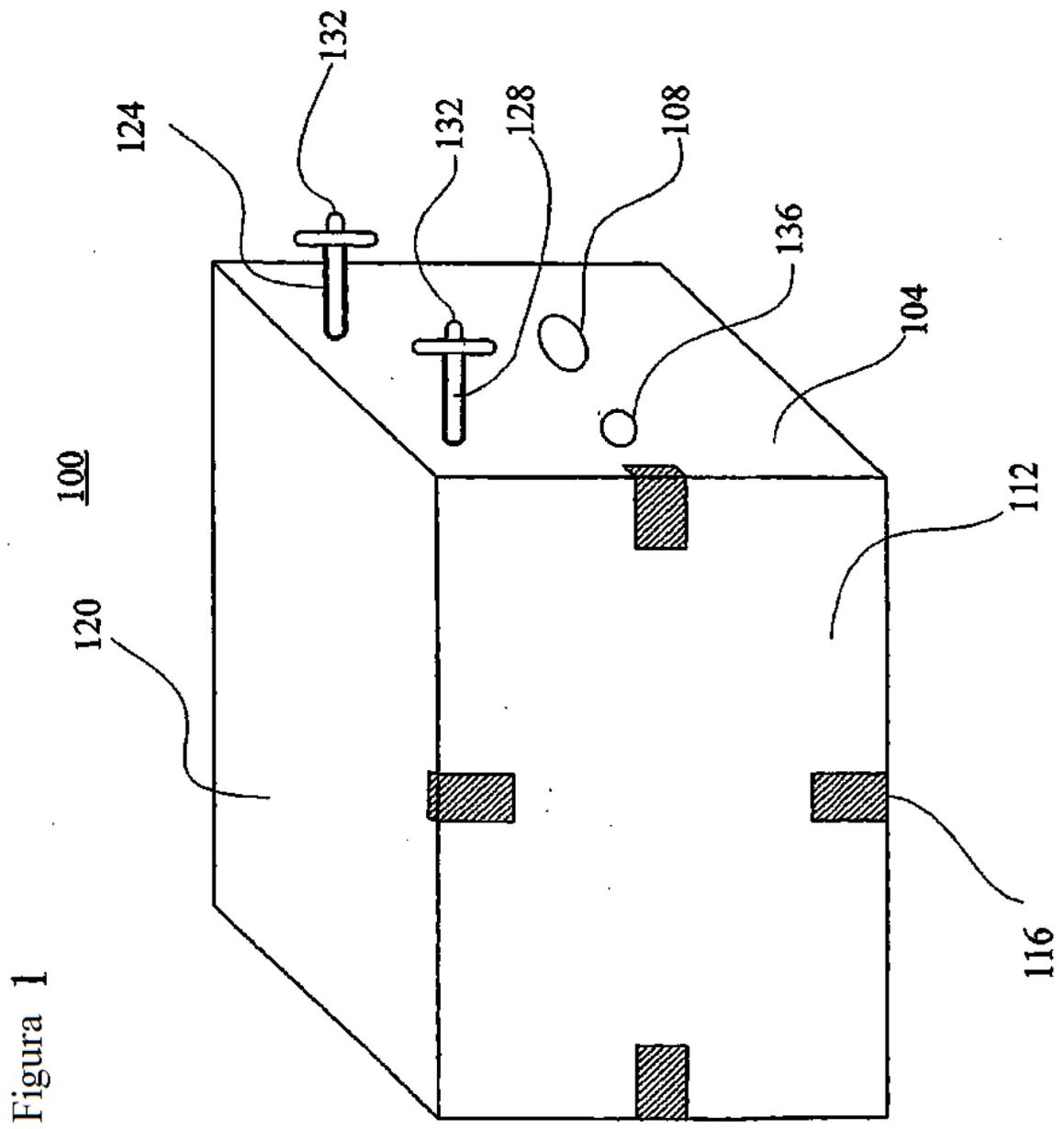


Figure 1

Figura 2

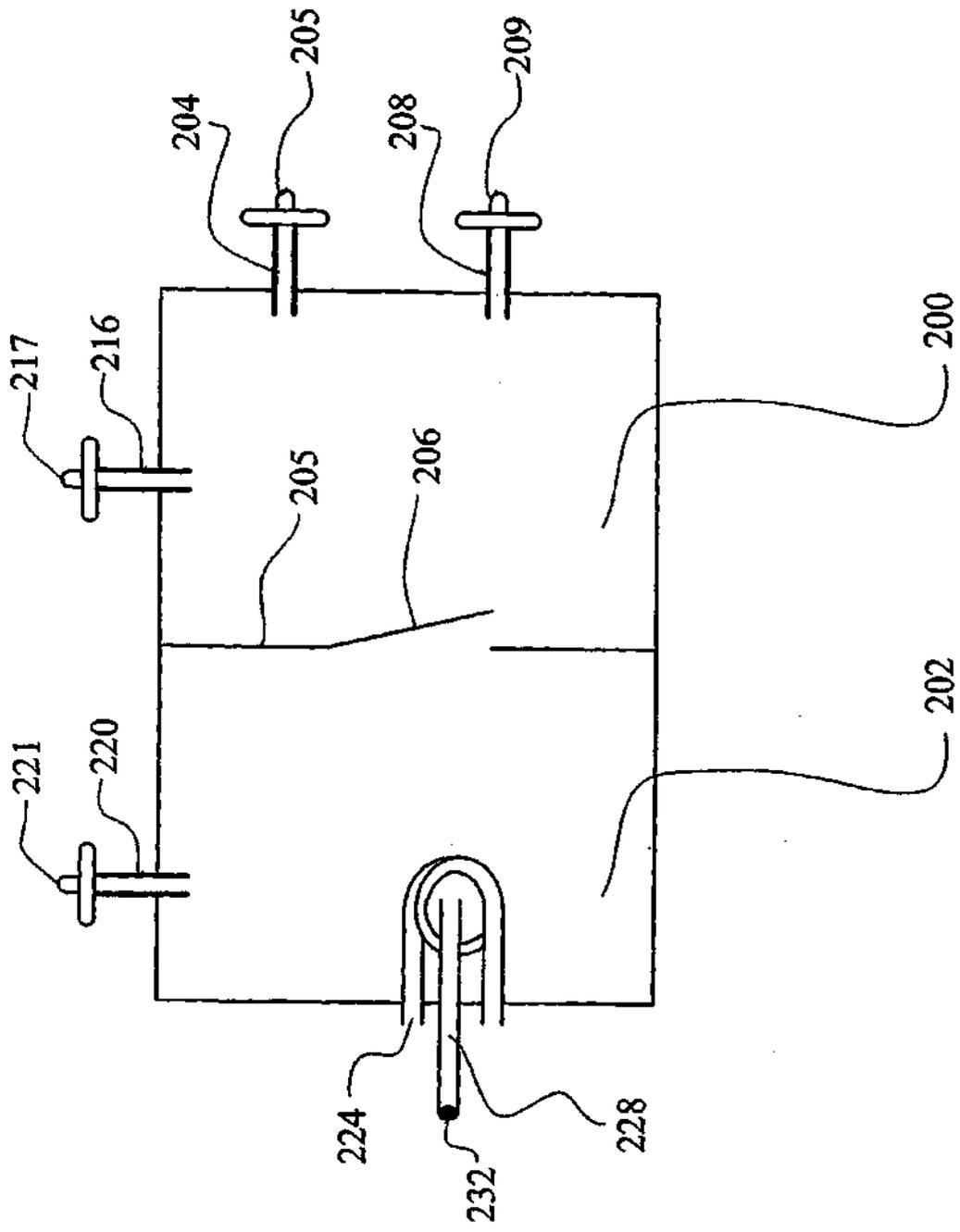


Figura 3

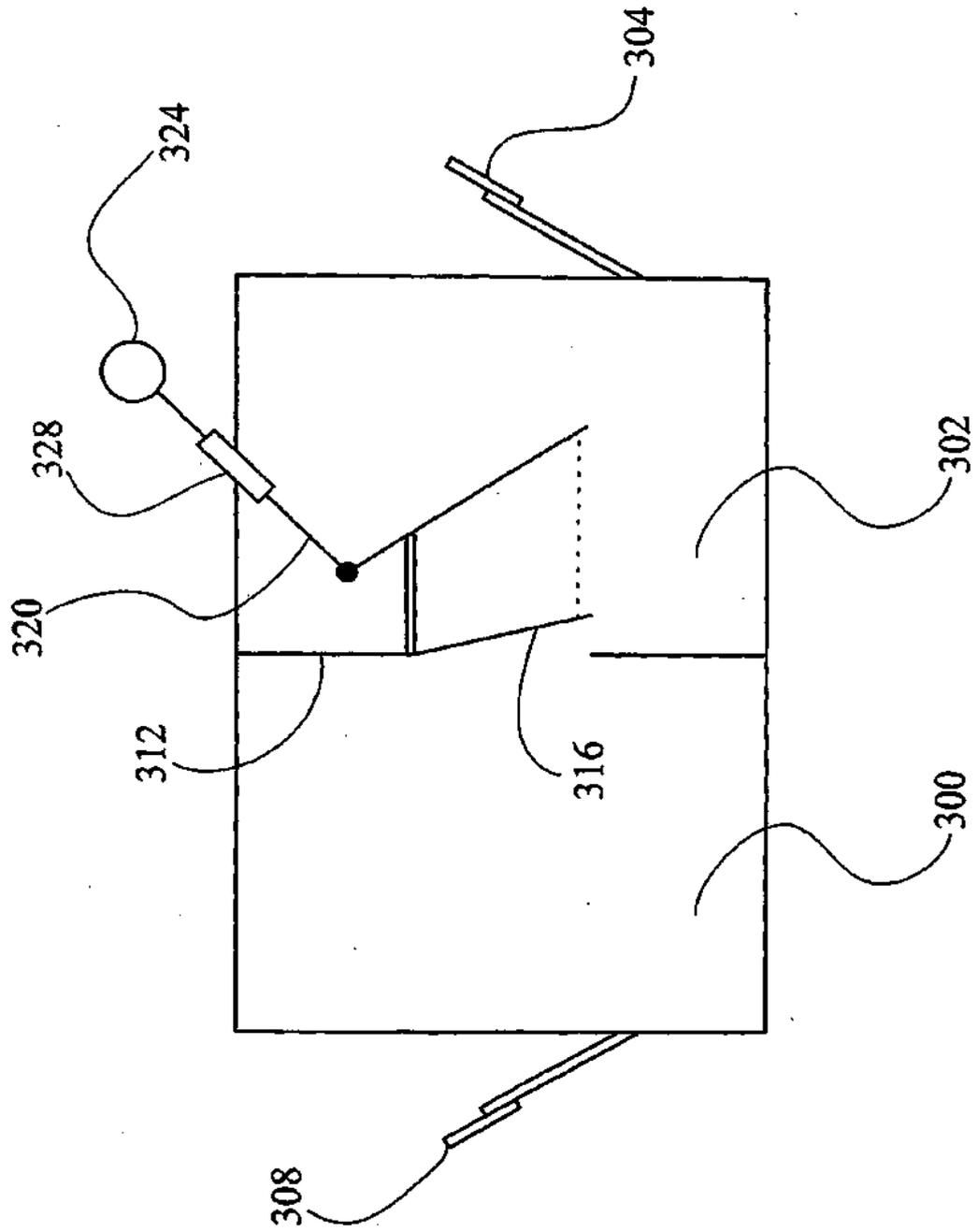


Figura 4

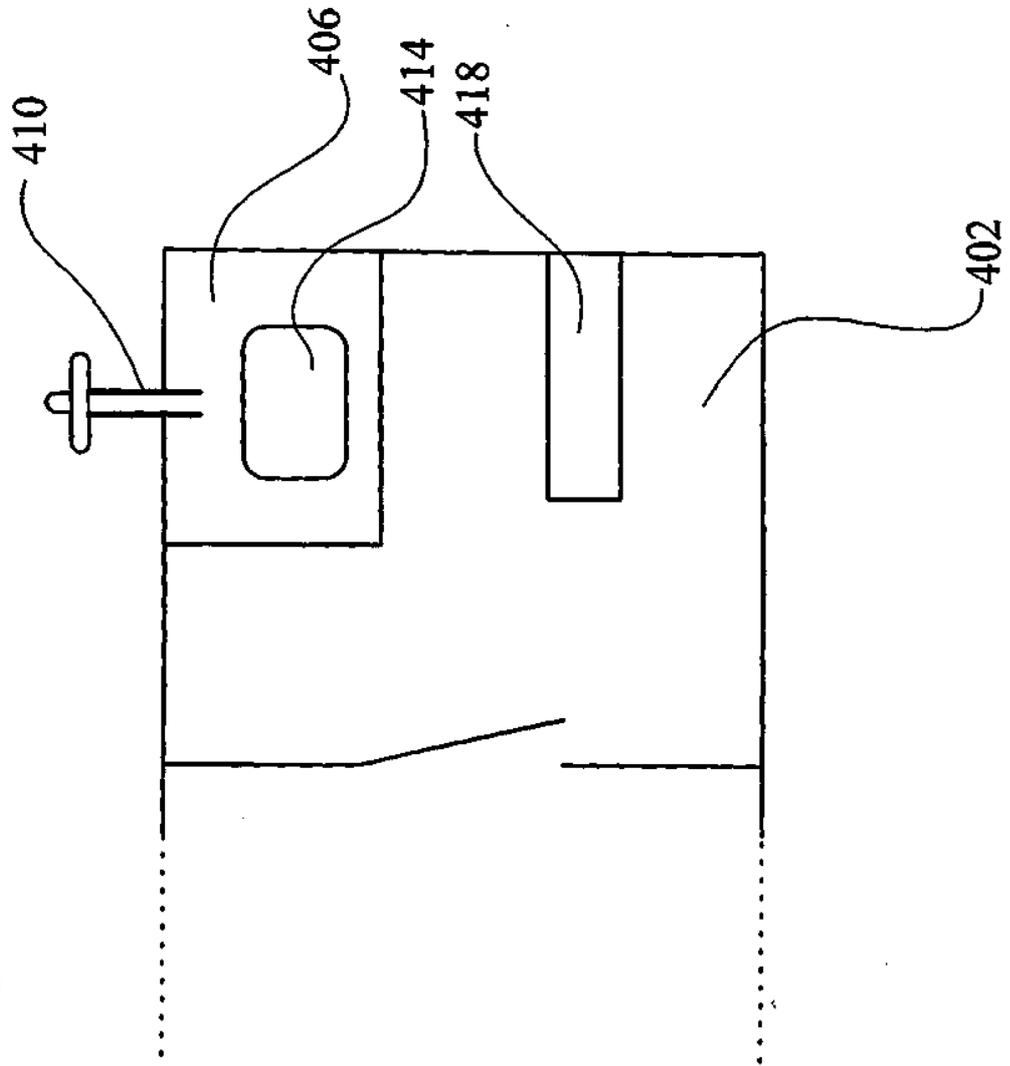


Figura 5

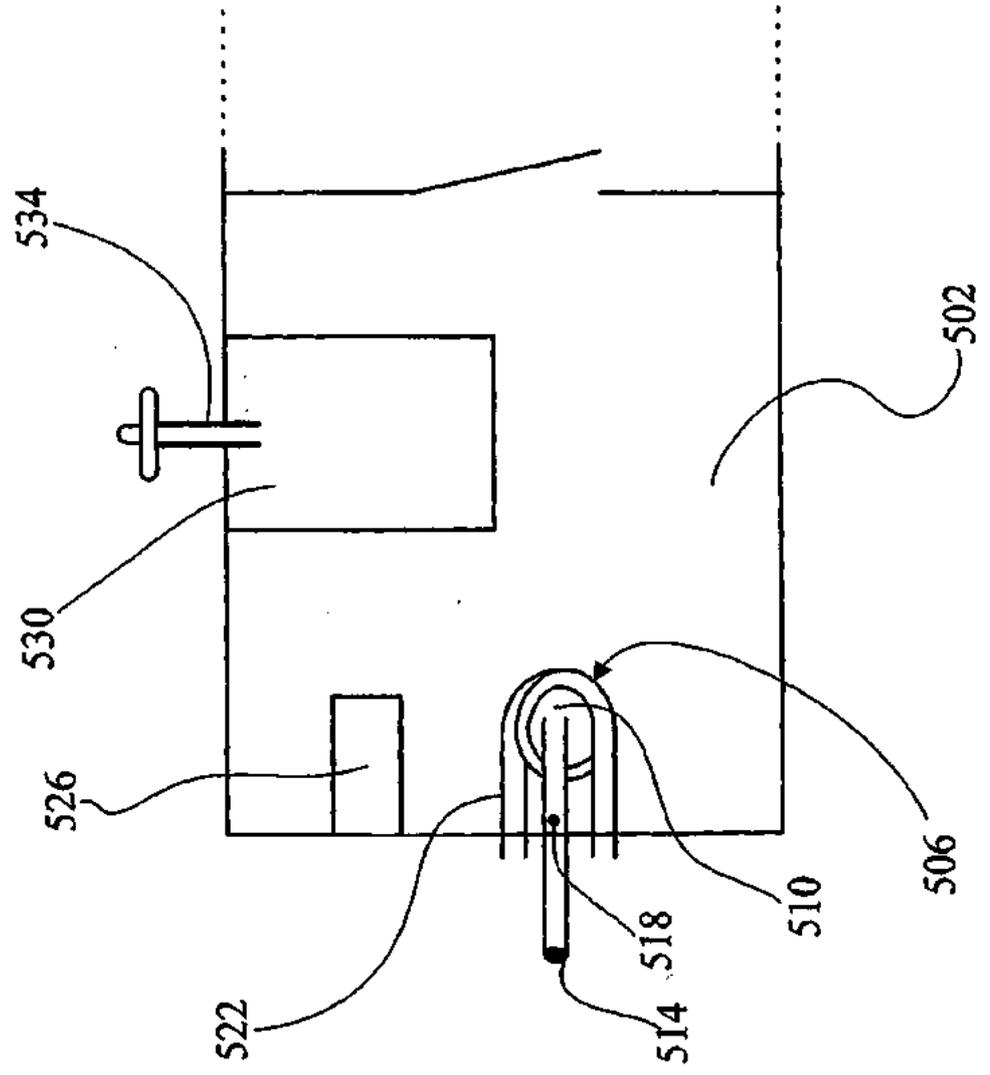


Figura 6A

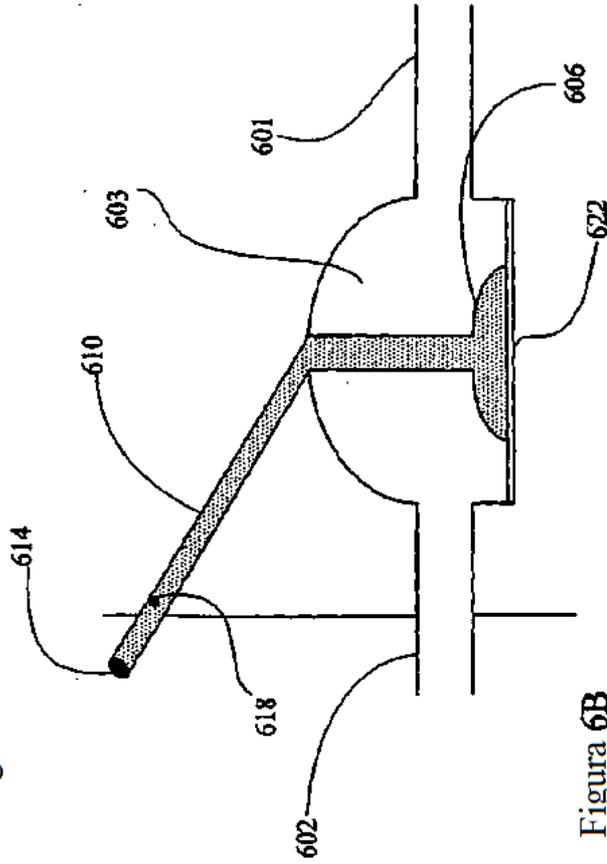


Figura 6B

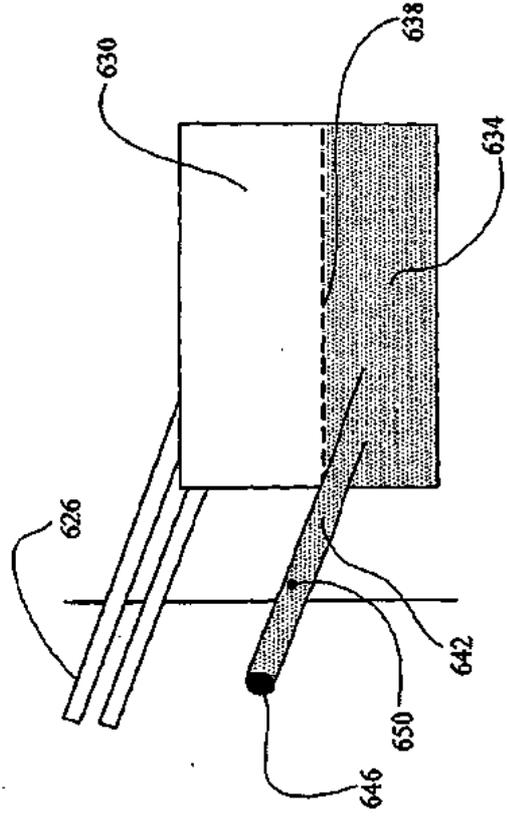


Figura 7A

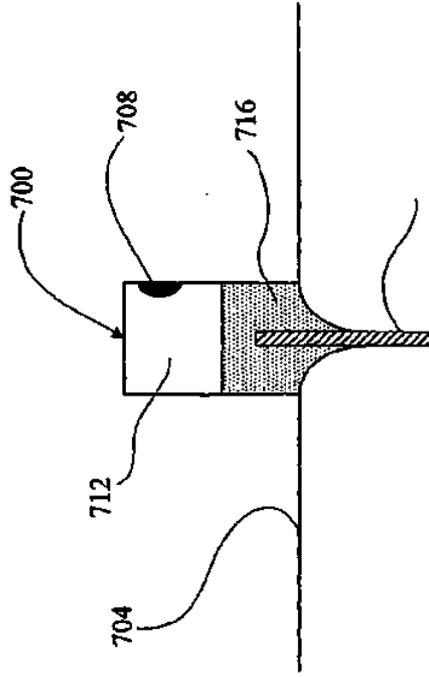
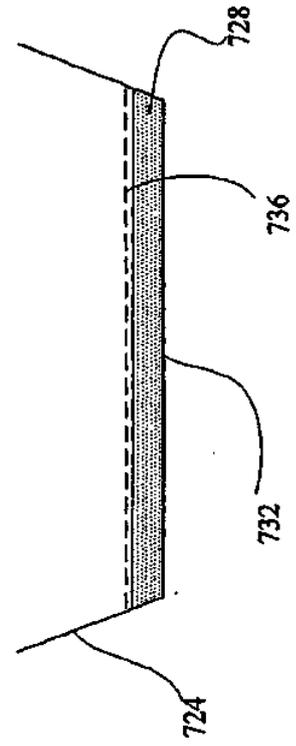


Figura 7B



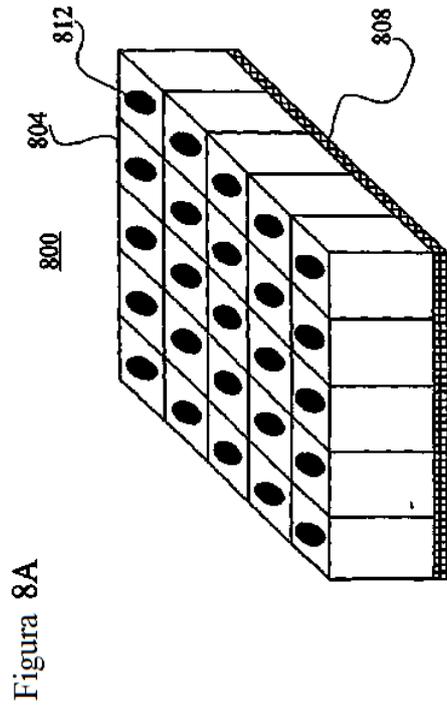


Figura 8A

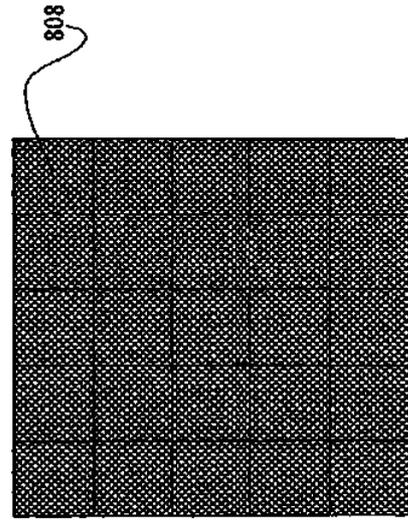


Figura 8B

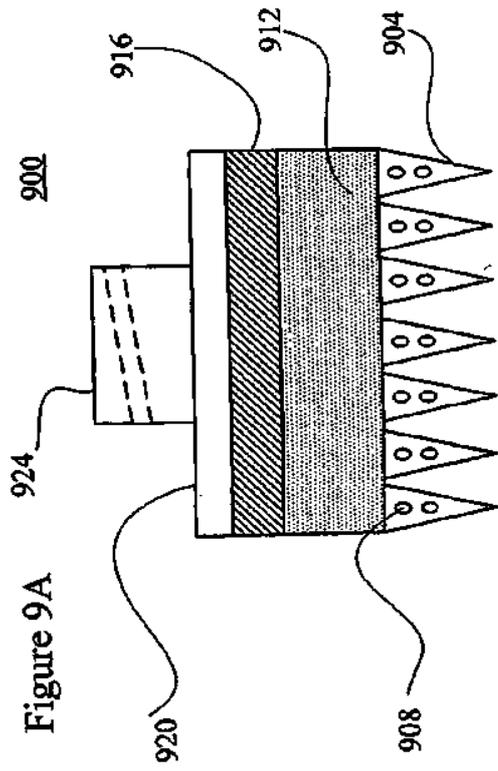


Figure 9B

