

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 758**

51 Int. Cl.:

A61K 39/015 (2006.01)

C07K 14/445 (2006.01)

A61P 33/06 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2003 E 10163236 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2277533**

54 Título: **Procedimientos de vacunación contra la malaria**

30 Prioridad:

23.10.2002 US 420265 P

13.02.2003 US 447026 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.12.2016

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
NAVY (50.0%)

72 Inventor/es:

HOFFMAN, STEPHEN L.;
WANG, RUOBING;
EPSTEIN, JUDITH E. y
COHEN, JOSEPH D.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 594 758 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

Procedimientos de vacunación contra la malaria

Introducción

La malaria es uno de los grandes problemas de salud pública en los trópicos y subtrópicos. Cada año, 300 a 500 millones de personas contraen nuevas infecciones por *Plasmodium*, y hasta 2,7 millones mueren de malaria en el mundo desarrollado (110). *Plasmodium falciparum* es la especie de *Plasmodium* responsable de la mayoría de las muertes debidas a la malaria.

El ciclo vital de *P. falciparum* se produce en cuatro etapas separadas, tres de las cuales se producen en el cuerpo humano. Véase 115 generalmente. En la primera etapa, un mosquito que lleva esporozoítos infecciosos en sus glándulas salivales obtiene una sangre ingerida de una persona y, como resultado, transmite estos esporozoítos a la circulación sanguínea de la persona. Una vez en las células del parénquima del hígado, los esporozoítos se reproducen para formar merozoítos. En la segunda etapa, los merozoítos se desplazan a través de la circulación sanguínea, infectando a los glóbulos rojos (RBC). Una vez el RBC está lleno de merozoítos, explota, liberando progenie que infecta a los nuevos RBC. La anemia es un síntoma común como esta etapa de infección. Con el tiempo, algunos de estos RBC también producirán gametocitos masculinos y femeninos (la tercera etapa). En la etapa final, un mosquito no infectado se alimenta de una persona infectada, ingiriendo los gametocitos. En el mosquito, la fecundación del gametocito femenino con el tiempo conduce a la producción de esporozoítos infecciosos, completando así el ciclo.

Cuando un patógeno tal como *P. falciparum* entra en el cuerpo humano, el cuerpo responde activando el sistema inmunitario. Al principio, se produce una respuesta generalizada, seguida de una respuesta específica de patógeno. La respuesta específica de patógeno dirige los antígenos únicos al patógeno invasor. Los dos brazos principales de la respuesta específica de patógeno son celular y humoral. Los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ participan en la respuesta inmunitaria celular. Específicamente, los linfocitos T CD8⁺ producen citocinas tales como interferón gamma (IFN-γ), que tiene una variedad de efectos estimulantes sobre otros componentes del sistema inmunitario tales como los macrófagos. Una clase especial de linfocitos T CD8⁺, los linfocitos T citotóxicos (CTL), destruyen específicamente células infectadas que expresan antígenos de patógeno sobre su superficie. A diferencia, los linfocitos T CD4⁺ o linfocitos T colaboradores promueven el desarrollo de CTL e inducen a que los linfocitos B se dividan y por último lugar produzcan anticuerpos. Los linfocitos T colaboradores pueden dividirse en dos subconjuntos, linfocitos T CD4⁺ T_H1 y T_H2, que se identifican según el perfil de citocinas que producen. El segundo brazo de la respuesta inmunitaria específica de patógeno consiste en la respuesta humoral, en la que los linfocitos B se reproducen, diferencian, y con el tiempo producen anticuerpos que se unen directamente a patógenos. Los anticuerpos son particularmente útiles para el recubrimiento de un patógeno no asociado a ninguna célula huésped. Entonces, las células fagocíticas, tales como macrófagos, engullen a patógenos recubiertos de anticuerpo.

En el contexto de una infección palúdica, los diferentes brazos de la respuesta inmunitaria específica de patógeno son los más eficaces en etapas particulares del ciclo vital de *P. falciparum*. Cuando los esporozoítos infecciosos se desplazan al hígado y entran en las células del hígado, los esporozoítos se convierten en patógenos intracelulares, pasando poco tiempo fuera de las células infectadas. En esta etapa, los linfocitos T CD8⁺ y los linfocitos T CD4⁺ son especialmente importantes, debido a que estos linfocitos T y sus productos de citocina, tales como IFN-γ, son principalmente responsables de la destrucción de las células huésped infectadas. Datos sustanciales del Programa de Malaria del Naval Medical Research Center (NMRC) y otros laboratorios indican que la eliminación de los parásitos del hígado intracelulares en la malaria de la marina depende de respuestas de linfocitos T CD8⁺ dirigidas contra péptidos expresados por parásitos de la etapa de hígado (45). El agotamiento de linfocitos T CD8⁺ anula la protección contra la exposición a esporozoítos (27, 31, 90, 93, 108) y la transferencia adoptiva de linfocitos T CD8⁺ a animales sin tratamiento previo confiere protección (56, 85, 87, 109).

Las vacunas de ADN inducen respuestas inmunitarias celulares, que incluyen las respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺ y de linfocitos T CD4⁺ sesgadas hacia Th1 específicas de antígeno que son los principales mecanismos de protección contra patógenos intracelulares y tumores (6, 11, 45, 63, 104, 106). Sin embargo, hasta la fecha, las vacunas de ADN han demostrado ser inferiores a las óptimas para la inducción de respuestas inmunitarias protectoras en seres humanos.

A diferencia, cuando una infección palúdica llega a la segunda etapa e infecta a los RBC, los merozoítos infecciosos no solo se reproducen dentro de los RBC, circulan libremente en la circulación sanguínea. Los anticuerpos son los más eficaces en resolver esta etapa de infección por dos motivos. Primero, los CTL requieren células huésped infectadas para presentar antígenos sobre una proteína especial llamada MHC-I. Los RBC no expresan MHC-I, reduciendo así la eficacia de CTL. Segundo, como se trató anteriormente, los anticuerpos median en la fagocitosis de patógenos no asociados a las células huésped. Así, en la segunda etapa de la infección, tanto los linfocitos B como los linfocitos T CD4⁺, que estimulan a los linfocitos B, son importantes para combatir la infección.

La complejidad de la respuesta inmunitaria humana a *P. falciparum*, además de un ciclo vital del parámetro multi-etapa con expresión de proteínas específica de etapa, contribuyen a la dificultad de desarrollar una vacuna contra *P.*

falciparum. Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de una vacuna contra la malaria.

La etapa de esporozoito de *P. falciparum* se ha identificado como una posible diana de una vacuna contra la malaria. La principal proteína de la superficie del esporozoito se conoce como la proteína del circumsporoito (proteína CS). Se ha clonado, expresado y secuenciado una proteína de la cepa 7G8 h (21). Se caracteriza por que tiene una región de repetición inmunodominante central que comprende un tetrapéptido Asn-Ala-Asn-Pro repetido 37 veces, pero intercalado con cuatro repeticiones secundarias Asn-Val-Asp-Pro. En otras cepas, el número de repeticiones principales y secundarias varía, además de su posición relativa. Esta porción central está flanqueada por una porción del extremo N y C compuesta de secuencias de aminoácidos no repetitivas diseñadas como la porción sin repetición de la proteína CS.

Se desarrolló una vacuna basada en ADN que contiene un plásmido que expresa el gen del circumsporoito de *P. falciparum* (PfCSP) por Vical, Inc. San Diego, CA y el Naval Medical Research Center (47). La vacuna estuvo compuesta de ADN desnudo en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de 2500 µg por 1 ml. El plásmido contuvo el gen de longitud completa que codifica el gen PfCSP entero, con expresión controlada por un promotor/potenciador del gen IE del CMV, la región no traducida de 5' del gen IE del CMV, y el terminador transcripcional del gen de la hormona de crecimiento bovina (64). Para potenciar la expresión y secreción del antígeno en células de mamífero, la secuencia que codifica el péptido conductor de la proteína del activador tisular del plasminógeno humano (hTPA) se añadió al extremo 5' de la secuencia codificante. Así, las dos secuencias del marco de lectura abierto contenidas en el plásmido PfCSP codifican la proteína de resistencia a kanamicina y la proteína de fusión conductor de hTPA/PfCSP (40). El plásmido de PfCSP contiene secuencias codificantes de proteínas virales u oncogénicas desconocidas. El plásmido contiene 6261 pares de bases de nucleótidos y tiene un peso molecular de $4,07 \times 10^6$ gmu, suponiendo que el par de bases promedio de ADN es 650 gmu.

Se construyó el plásmido de ADN de PfCSP usando segmentos de ADN clonado que se obtuvieron de plásmidos purificados utilizando técnicas de genética molecular convencionales. El plásmido se produjo en cultivo celular bacteriano (*E. coli*) con un medio de selección de kanamicina. Después de la fermentación de las células bacterianas, se purificó ADN de plásmido.

Los estudios de inmunogenicidad preclínica de la vacuna de ADN de PfCSP se realizaron en el NMRC antes de comenzar los ensayos clínicos. Específicamente, el plásmido de PfCSP se transfirió transitoriamente dentro de células de mamífero cultivadas después de que se evaluara la expresión del antígeno por análisis de inmunotransferencia. Este plásmido también se probó para su capacidad para inducir respuestas de anticuerpo y de CTL específicas de antígeno en ratones y primates no humanos (40, 105). Estudios en el modelo de ratón demostraron la inducción de respuestas de CTL y de anticuerpos específicas de antígeno tras la inmunización con ADN de plásmido (30). Los estudios establecieron adicionalmente que la vía intramuscular (IM) de inmunización era óptima para la inducción de respuestas inmunitarias CD8⁺ Th1, como se informa en otros sistemas (30). Además, estudios posteriores mostraron que los seis monos Rhesus inmunizados por la vía IM con el plásmido de PfCSP, tanto solo como en combinación con hasta cuatro otros plásmidos que codifican otras proteínas de *P. falciparum* de etapa de hígado pre-eritrocítico, tuvieron respuestas de CTL y/o de anticuerpos específicas de antígeno detectables (106).

Antes del uso en ensayos clínicos, se realizaron amplios estudios de seguridad preclínica. Estos estudios incluyeron 1) un estudio de distribución en tejido de ratón de ADN de plásmido administrado tanto por vía intravenosa (IV) como por vía IM; 2) estudios de seguridad de dosis repetidas en ratones y conejos; y 3) estudios de integración de ADN de plásmido en ratones (67, 75). Estos estudios se resumen a continuación.

Estudios de distribución de plásmidos: Parker et al. evaluaron la distribución de plásmidos en diferentes tejidos de ratones (75). Los ratones recibieron una dosis única del plásmido PfCSP, que era 25 veces la mayor dosis en mg/kg recomendada para seres humanos, tanto IV como IM. Se recogieron los tejidos y se usó PCR para evaluar la presencia de ADN de plásmido en los siguientes momentos de tiempo: 1 hora, 2 días y 4 semanas después de la administración después de la administración IV y 2 días, 4 semanas y 8 semanas después de la administración IM. El ADN de plásmido se encontró distribuido a través de todos los tejidos una hora después de la administración IM. 2 días después de la administración IM, se encontró plásmido solo en médula ósea, sangre y en el sitio de inyección, con los mayores niveles en el sitio de inyección. Se detectó ADN de plásmido solo en el sitio de inyección 1 semana después de la administración IM. Después de la administración IV, el plásmido de ADN de PfCSP se encontró distribuido en bajos niveles en todos los tejidos, excepto las gónadas y el cerebro. Cuatro semanas después de la administración IV, el plásmido de ADN se detectó solo en el pulmón de un animal.

Estudios de seguridad de dosis repetidas: Parker et al. también trataron la seguridad de administrar dosis repetidas de la vacuna en ratones y conejos (75). En un estudio de seguridad de dosis repetidas en ratones, los animales recibieron 8 inyecciones IM repetidas del plásmido de ADN de PfCSP durante un periodo de 28 días a dosis de 1,0 µg, 10 µg y 100 µg (dosis acumuladas equivalentes a 5-500 veces la dosis humana propuesta en una base de mg/kg). No hubo evidencia de hematología anormal o química del suero, histopatología anormal o inducción de anticuerpos antinucleares o anticuerpos para ADNbc. En un estudio de seguridad de dosis repetidas en conejos, los animales recibieron seis inyecciones IM semanales del plásmido a dosis de 150 µg y 450 µg. Otra vez, al igual que en los estudios murinos, no hubo evidencia de hematología anormal o química del suero, histopatología anormal o

inducción de anticuerpos antinucleares o anticuerpos para ADNbc. Así, los estudios de Parker mostraron que el plásmido de PfCSP se distribuye bien a través de los tejidos del huésped, que el plásmido se retuvo en algunos de aquellos tejidos durante periodos prolongados, y que el plásmido es seguro para su uso en el hombre, como se muestra por la ausencia de reacción adversa cuando se administra a un voluntario.

5 Estudios de integración: Martin et al. evaluaron si el plásmido de PfCSP se integra dentro del ADN cromosómico del huésped (67). Se inyectó una dosis única de ADN de plásmido en cada ratón y los tejidos se analizaron 30 y 60 días después de la administración por análisis por PCR a una sensibilidad de 1-10 copias por microgramo de ADN. En general, estos estudios no proporcionaron evidencia de integración del plásmido y sugirieron que si hay alguna integración de ADN de plásmido dentro del ADN genómico, es a un nivel extremadamente bajo, varios miles de veces inferior al esperado de la mutación espontánea.

Una vez los investigadores verificaron la seguridad de la vacuna de PfCSP, el NMRC realizó dos ensayos clínicos de fase I. En el primer ensayo, voluntarios adultos sanos que no habían recibido tratamiento previo para la malaria recibieron la vacuna de ADN de PfCSP entre 1997 y 1998 (33, 62, 105, 106). Se enrolaron un total de 20 voluntarios y 5 voluntarios se asignaron a cada uno de los cuatro grupos de dosificación: 20 µg, 100 µg, 500 µg y 2500 µg con 3 dosis administradas a intervalos de un mes. Como se describe por Le et al., todas las dosis fueron bien toleradas sin episodios de acontecimientos adversos graves o serios (62). Hubo cuatro acontecimientos adversos moderados; se consideró que era poco probable que estuvieran relacionados con la administración de la vacuna. La molestia más común fue dolor y dolor con la palpación en el sitio de inyección. Éste fue leve, durando menos de 48 horas, y no requirió medicación. Ningún voluntario tuvo anomalías bioquímicas del suero significativas.

Ninguno de los 20 sujetos tuvo la inducción de anticuerpos anti-ADNbc o un aumento en el título de ANA (anticuerpo antinuclear) desde el nivel inicial. Wang et al. mostraron que ninguno de los voluntarios desarrolló anticuerpos para PfCSP como se evalúa por la prueba de anticuerpos fluorescentes indirecta (IFAT) contra esporozoítos secados al aire y enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) contra péptidos recombinantes y sintéticos. Sin embargo, 11 de los 20 voluntarios tuvieron actividad de CTL genéticamente limitada específica de antígeno. Específicamente, las respuestas de CTL fueron dependientes de linfocitos T CD8⁺, específicas de péptido y genéticamente limitadas por HLA, ya que hubo poco o ningún reconocimiento de dianas autólogas que se incubaron con un péptido de control o de dianas no coincidentes con la clase I del HLA que se incubaron con el péptido específico. Además, los CTL inducidos por ADN se limitaron genéticamente por múltiples alelos de HLA (105, 107). La positividad de CTL estuvo relacionada con la dosis. En los 9 voluntarios restantes, los CTL no se detectaron en ningún ensayo realizado después de cada una de las inmunizaciones.

En el segundo ensayo clínico, iniciado en abril de 1999, 14 voluntarios adultos sanos se inmunizaron a las 0, 4 y 8 semanas con la vacuna de ADN de PfCSP por tres vías diferentes: IM con aguja convencional (intramuscular), IM con Biojector® e IM con Biojector® (70 % de dosis) más ID (intradérmica) (30 % de dosis). Biojector® es un dispositivo de inyección por chorro sin aguja. Dado el pequeño tamaño del estudio, la diversidad de HLA de los voluntarios se limitó al sub-tipo de clase I de HLA más común en esta población, HLA A2, para permitir comparaciones entre grupos de la respuesta de CTL genéticamente limitada. Diez de los voluntarios que participaron en este estudio participaron posteriormente en un ensayo adicional que empleó los procedimientos de la invención. Este ensayo y su resultado se describen adicionalmente en la sección de "Ejemplos" más adelante.

En general, la vacuna fue segura y bien tolerada. Los voluntarios no experimentaron ningún acontecimiento adverso (AE) grave o serio que estuviera relacionado con la vacuna. Ninguno de los voluntarios experimentó anomalías de laboratorio significativas asociadas a la administración de la vacuna de PfCSP por ninguna de las tres vías probadas (33).

Con respecto a las respuestas inmunitarias a la vacuna, ninguno de los voluntarios desarrolló anticuerpos a PfCSP como se evalúa por IFAT contra esporozoítos secados al aire y ELISA contra péptidos recombinantes y sintéticos (107). La ausencia de anticuerpos específicos para PfCSP fue algo sorprendente, debido a que tanto los dispositivos de inyección por chorro Biojector como la vía ID de inmunización se han asociado a producción mejorada de anticuerpos en modelos animales (1, 37, 62). Las respuestas de linfocitos T se midieron por IFN-γ en ensayos de ELISPOT. En la realización de estos ensayos se usaron péptidos que incluyen epítopes de linfocitos T de la proteína CSP codificada por el plásmido de PfCSP.

Los cuatro voluntarios en el grupo IM de aguja respondieron a 7/9 péptidos en el 17,6 % (26/148) de los ensayos. Los cinco voluntarios en el grupo IM de Biojector respondieron a 9/9 péptidos en el 26,5 % (49/185) de los ensayos. Cuatro de los cinco voluntarios en el grupo IM/ID de Biojector respondieron a 7/9 péptidos en el 17,3 % (32/185) de los ensayos. Ocho de los 14 voluntarios tuvieron respuestas de CTL detectables. De aquellos ocho, dos estuvieron en el grupo IM de aguja (que responden a 4/7 péptidos en un total de 5/126 ensayos), tres estuvieron en el grupo IM de Biojector (que responden a 6/8 péptidos en un total de 11/168 ensayos) y tres estuvieron en el grupo IM/ID de Biojector (que responden a 6/6 péptidos en un total de 14/162 ensayos) (107). En general, este ensayo estableció que la vía IM de Biojector de inoculación era la más eficaz para inducir una respuesta de IFN-γ específica de antígeno y que la vía IM o IM/ID de Biojector era la más eficaz en inducir respuestas de CTL específicas de antígeno.

En resumen, estos dos ensayos clínicos demuestran que la vacuna de polinucleótido de PfCSP puede provocar una respuesta de linfocitos T CD8⁺ genéticamente limitada específica de antígeno como se mide por la actividad de CTL dependiente de linfocitos T CD8⁺ genéticamente limitada específica de péptido y por la producción de IFN-γ (105, 107). Voluntarios del segundo ensayo clínico, cuando se probaron un año después de la administración de la última dosis de la vacuna de polinucleótido de PfCSP, dejaron de demostrar cualquier respuestas de linfocitos T CD8⁺ específicas de antígeno como se mide anteriormente.

Como se trata anteriormente, además de las respuestas de linfocitos T CD8⁺, los anticuerpos contra cualquier péptido de la proteína PfCSP también desempeñan una función importante en controlar las infecciones palúdicas (1, 78, 99). Aunque la mayoría de los receptores de la vacuna de ADN de PfCSP desarrollaron respuestas de linfocitos T CD8⁺ específicas de antígeno, ninguno desarrolló ningún anticuerpo específico anti-CSP. A diferencia, los investigadores han mostrado que RTS,S pueden provocar fuertes respuestas de anticuerpos a CSP (53, 99, 100). RTS,S también es un potente inductor de inmunidad celular y humoral de tipo TH-1 con respuestas de linfocitos T CD4⁺ específicas de RTS,S centradas predominantemente en la región polimórfica inmunodominante de Th2R (61).

La administración de 2 o 3 dosis de RTS,S ha protegido a una media del 44 % de más de 60 voluntarios expuestos a *P. falciparum* 2-3 semanas después de la última inmunización (8, 54, 99), y protegió al 70 % de gambiaños semi-inmunes durante 2 meses después de la última inmunización (8). Sin embargo, esta protección es de corta duración (8, 100). La inmunización con RTS,S induce anticuerpos anti-PfCSP y respuestas de IFN-γ dependientes de linfocitos T CD4⁺, pero no se han detectado respuestas de CTL o IFN-γ dependientes de linfocitos T CD8⁺ (61).

LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un nuevo esquema de vacuna que sensibiliza una respuesta inmunitaria con una vacuna de sensibilización que comprende un polinucleótido que codifica al menos un primer antígeno palúdico y entonces refuerza la respuesta sensibilizada con una vacuna de refuerzo que comprende al menos un polipéptido que comprende al menos un segundo antígeno palúdico que tiene al menos un epítipo en común con el al menos un primer antígeno de la malaria de la vacuna de sensibilización. Esta combinación proporciona tres mejoras significativas a las actuales estrategias de vacunación contra la malaria.

Primera, la combinación de dos vacunas heterólogas activa ambos brazos del sistema inmunitario, linfocitos T CD8⁺, linfocitos T CD4⁺ y anticuerpos. Específicamente, basándose en los resultados de ensayos clínicos usando la vacuna de PfCSP o la vacuna de RTS,S, ninguna vacuna sola estableció una respuesta inmunitaria sostenible que invocara a los linfocitos T CD8⁺, linfocitos T CD4⁺ y anticuerpos para CSP. La presente invención mejora este resultado, combinando las dos vacunas, provocando así los tres tipos de respuestas. Específicamente, la vacuna de PfCSP sensibiliza una respuesta de linfocitos T CD8⁺ y la vacuna de RTS,S refuerza esa respuesta de linfocitos T. Como la vacuna de RTS,S también provoca a anticuerpos anti-CSP y linfocitos T CD4⁺, la respuesta inmunitaria resultante a CSP incluye tanto las respuestas de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ como las respuestas de anticuerpos. Los presentes inventores se refieren a esta estrategia de vacunación global, sensibilizar con una vacuna y entonces reforzar con una vacuna diferente que comparte al menos un epítipo común con la vacuna de sensibilización, como una estrategia de "sensibilización/refuerzo".

La segunda mejora significativa de la invención con respecto a las estrategias de vacunación se basa en el hecho de que emplea una vacuna de proteína para estimular una respuesta de linfocitos T CD8⁺ en seres humanos. El procedimiento de la invención refuerza las respuestas de linfocitos T usando una vacuna basada en proteína que era considerada hasta la fecha ineficaz en estimular las respuestas de linfocitos T CD8⁺ (61).

Finalmente, la tercera mejora significativa con respecto a las actuales estrategias de vacunación contra la malaria proporcionadas por la invención es que amplía la respuesta inmunitaria de dos formas. Primero, se indujo un repertorio más amplio de linfocitos T productores de IFN-γ (Tc1 y Th1) por sensibilización con ADN/refuerzo con RTS,S, ya que la sensibilización con ADN inició tanto las respuestas de IFN-γ de tipo 1 CD8⁺ (Tc1) como de tipo 1 CD4⁺ (Th1) dependientes de linfocitos T CD4⁺, mientras que RTS,S sola indujo solo las respuestas de IFN-γ Th1 dependientes de linfocitos T CD4⁺. Segunda, cuando se administra sola, la vacuna de PfCSP sensibiliza a cierta población de linfocitos T CD8⁺. Asimismo, la vacuna de RTS,S solo sensibiliza a cierta población de linfocitos T CD4⁺ y linfocitos B que forman un cierto conjunto de anticuerpos. Cuando se combinan, sin embargo, la respuesta de linfocitos T CD8⁺ resultante no solo cubre los epítopos inicialmente sensibilizados por la vacuna de PfCSP, la respuesta también cubre epítopos adicionales no inicialmente identificados después de la sensibilización por la vacunación con PfCSP. El concepto de que una vacuna de proteína reforzaría una respuesta de linfocitos T CD8⁺ establecida, además de ampliarla, es inesperado en vista de lo que se conocía en la técnica sobre las vacunas de proteína.

Breve descripción de la invención

La presente divulgación se refiere a procedimientos para inmunizar a un ser humano contra la malaria, que comprenden las etapas de: a) sensibilizar una respuesta inmunitaria en un ser humano por administración de una vacuna de sensibilización que comprende un polinucleótido que codifica al menos un antígeno de la malaria; y b) reforzar la respuesta inmunitaria sensibilizada por la posterior administración de una vacuna de refuerzo que

comprende al menos un polipéptido que comprende al menos un antígeno de la malaria que tiene al menos un epítipo en común con el antígeno de la malaria o antígenos de la vacuna de sensibilización para invocar tanto una respuesta inmunitaria celular como una respuesta inmunitaria humoral contra la malaria.

- En una realización, la vacuna de sensibilización codifica el mismo polipéptido presente en la vacuna de refuerzo. En otras realizaciones, tanto la vacuna de sensibilización codifica parte del antígeno de la malaria presente en la vacuna de refuerzo como el polipéptido presente en la vacuna de refuerzo es una porción del antígeno de la malaria codificado por la vacuna de sensibilización. En otra realización, las vacunas comparten al menos un epítipo de linfocito T palúdico. En otra realización más, las vacunas comparten al menos un epítipo de linfocito T CD8⁺ palúdico. En una realización alternativa, las dos vacunas comparten varios epítopes palúdicos.
- Cualquier patógeno que produzca malaria puede usarse en el procedimiento de la invención. En una realización, el patógeno es *P. falciparum*. En otras realizaciones, por ejemplo, el patógeno puede ser *P. vivax*, *P. ovale* o *P. malariae*. Asimismo, el procedimiento de la invención puede usarse con cualquier antígeno de la malaria expresado en cualquier etapa del ciclo vital del patógeno. En una realización, la vacuna de sensibilización codifica y la vacuna de refuerzo comprende uno o más antígenos expresados durante la etapa de pre-RBC del patógeno, que incluye la etapa del hígado. En otra realización más, el polinucleótido de la vacuna de sensibilización codifica al menos una porción de la proteína del circunsporozoíto y la vacuna de refuerzo comprende al menos una porción de la proteína del circunsporozoíto, que se expresa durante la etapa de infección del hígado. En otra realización adicional, el polinucleótido de la vacuna de sensibilización codifica sustancialmente toda la proteína del circunsporozoíto y la vacuna de refuerzo comprende una porción de la proteína del circunsporozoíto. La porción mínima de la proteína CS es una porción inmunogénica que comprende al menos un epítipo o varios epítopes. En una realización específica, la vacuna de sensibilización comprende PfCSP y la vacuna de refuerzo comprende RTS,S. En otra realización, la vacuna de sensibilización es la vacuna de PfCSP y la vacuna de refuerzo es la vacuna de RTS,S.

La divulgación proporciona además un kit farmacéutico que comprende las vacunas de sensibilización y de refuerzo como se describen en el presente documento.

- La invención proporciona además el uso de una vacuna de sensibilización y una vacuna de refuerzo como se describen en el presente documento, en la preparación de una vacuna para la prevención o reducción de la gravedad de la malaria.

Así, la divulgación proporciona el uso de un polinucleótido que codifica al menos un antígeno de la malaria, en particular la proteína CS o un fragmento de la misma, como una vacuna de sensibilización y un polipéptido que comprende el al menos un antígeno de la malaria, en particular la proteína CS o un fragmento de la misma, como vacuna de refuerzo, en la fabricación de una vacuna de sensibilización-refuerzo para la malaria. En una realización específica, un polinucleótido está en forma de un plásmido de ADN, que preferentemente expresa la proteína CS de longitud completa o un fragmento de la misma. El polinucleótido que codifica la proteína CS o fragmento puede estar bajo el control de un promotor heterólogo como se conoce en la técnica. En una realización, un promotor es el promotor IE de HCMV, que opcionalmente incluye el exón 1. En una realización específica, el polipéptido de la vacuna de refuerzo es una proteína híbrida que comprende la porción del extremo carboxi de la proteína CS, por ejemplo al menos 160 aminoácidos de la porción del extremo carboxi, excluyendo opcionalmente 12 aminoácidos del extremo carboxi. Cualquiera o ambas de las composiciones de sensibilización y de refuerzo puede comprender antígenos de la malaria adicionales u otros antígenos.

- Según la invención, la vacuna de sensibilización comprende un polinucleótido que codifica la proteína CS de longitud completa, presente en un plásmido de ADN bajo el control de un promotor heterólogo y la vacuna de refuerzo comprende RTS,S en combinación con un adyuvante inductor de Th1, particularmente un adyuvante que comprende QS21, 3D-MPL y una emulsión de aceite en agua. Las vacunas de sensibilización y de refuerzo pueden proporcionarse en forma de un kit farmacéutico.

- La invención proporciona protección parcial, potenciada o completa de un ser humano que previamente no se ha expuesto a un patógeno causante de la malaria, o se ha expuesto, pero no está completamente protegido. La invención también puede usarse para reducir la probabilidad de desarrollar una infección de malaria, reducir la probabilidad de enfermar cuando se infecta, reducir la gravedad de la enfermedad, tal como fiebre, cuando llega a infectarse, reducir la concentración de parásitos en la persona infectada, o reducir la mortalidad de la malaria cuando se expone a parásitos de la malaria. En regiones en las que la malaria es endémica, incluso la protección parcial es beneficiosa. Por ejemplo, una estrategia de tratamiento con vacuna que produce protección de aproximadamente el 30 % de una población puede tener un impacto significativo sobre una comunidad.

Breve descripción de los dibujos

- La FIG. 1 muestra respuestas de CTL para cada sujeto positivo y cada péptido positivo justo después de la sensibilización con ADN (Fig. 1a), justo antes del refuerzo con RTS,S (Fig. 1b), y entonces después del refuerzo con RTS,S (Fig. 1c). Las barras negras representan muestras que contienen péptido de prueba y la presentación de MHC adecuada. Las barras punteadas representan muestras que contienen un péptido de control y la presentación de MHC adecuada. Las barras rayadas representan muestras que contienen péptido de prueba sin

presentación de MHC adecuada. CMSP frescas tomadas después de la sensibilización con ADN (a), antes del refuerzo (b), o 2 semanas después de la primera (número de voluntario 6 = V6) o segunda (V2, 3, 8, y 9) dosis de RTS,S (c), se estimularon *in vitro* con ALVAC que expresa P_fCSP durante 7 días, y se ensayaron contra dianas de la misma clase I de HLA (péptido MHC+) o no coincidente (péptido no MHC+) incubadas con el péptido derivado de P_fCSP de 8-10 aminoácidos experimental o péptido de control (gag del VIH limitado a HLA-A*0201) (control MHC+), en un ensayo de liberación de cromo de 5 horas. Las respuestas se consideraron positivas solo si la diferencia entre el porcentaje de lisis de las células diana pulsadas con péptidos experimentales y de control fue $\geq 10\%$ para al menos 2 relaciones de célula efectora con respecto a célula diana (E:T). Se proporciona el porcentaje de lisis para cada péptido con sus controles simultáneamente evaluados a una única relación E:T (20:1 o 40:1).

La FIG. 2 caracteriza los linfocitos T implicados en respuestas de IFN- γ *in vitro* en las fases de inducción y efectora, respectivamente. Se realizaron ensayos de ELISPOT con CMSP congeladas de voluntarios inmunizados con 3 dosis de ADN de P_fCSP solo (V1 y V5) o 2 dosis de RTS,S sola (V19, V21 y V22), tanto tratados con Dynabeads de control como agotados en linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ inmediatamente antes del cultivo con péptidos (a) M A2 de la gripe, (b) TT-DR, (c) P_fCSP DR.363, o (d) P_fCSP DR.316. En paralelo, se midieron los niveles de expresión de ARNm de IFN- γ (e) por PCR en tiempo real en poblaciones de linfocitos T selectivamente enriquecidas (CD4⁺/CD45RA⁺, CD4⁺/CD45RA⁻, CD8⁺/CD45RA⁺ y CD8⁺/CD45RA⁻) del mismo voluntario en los mismos momentos de tiempo del estudio inmediatamente después de 36 horas de cultivo con los mismos conjuntos de péptidos probados en ensayos de ELISPOT.

La FIG. 3 muestra niveles de expresión de ARNm de IFN- γ en subconjuntos de linfocitos T medidos por PCR en tiempo real de IFN- γ . Se estudiaron las células congeladas de dos voluntarios (V1 y V5) adquiridas después de 3 dosis de ADN de P_fCSP (ADN solo) y después de que los individuos se hubieran reforzado con dos dosis de vacuna de RTS,S (ADN/RTS,S). Las células se incubaron con péptido P_fCSP DR.363 durante 36 horas, se enriquecieron selectivamente y se evaluaron para la expresión de ARNm de IFN- γ . Después de la inmunización con ADN, la expresión del ARNm de IFN- γ se reguló por incremento modestamente (5-10 veces) en linfocitos T CD4⁺ en el subconjunto CD45RA⁺ en el voluntario V1 y en el subconjunto CD45RA⁺ en el voluntario V5, pero no en linfocitos T CD8⁺. El refuerzo con RTS,S se asoció a un aumento significativo (80-100 veces) en los niveles de expresión de ARNm de IFN- γ en el subconjunto de T CD4⁺ regulado por incremento en ambos voluntarios, pero no en linfocitos T CD8⁺.

La FIG. 4 muestra un desplazamiento del patrón inducido por ADN de la respuesta de IFN- γ al péptido DR.316 (Tc1 CD8⁺ solo) después de la primera dosis de RTS,S a una mezcla de dos patrones (Tc1 CD8⁺ y Th1 CD4⁺) después de administrar una segunda dosis de la vacuna de RTS,S. En el ELISPOT *ex vivo* hecho con células del voluntario V2, (a) las respuestas de IFN- γ estuvieron significativamente reducidas por el agotamiento de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ antes del cultivo después de la primera dosis de RTS,S (una característica de las respuestas de IFN- γ inducidas por ADN). Después de la segunda dosis de vacuna de RTS,S, solo el agotamiento de linfocitos T CD4⁺ redujo significativamente la actividad. En paralelo, en la fase efectora por PCR en tiempo real (b), la expresión de ARNm de IFN- γ se reguló por incremento en linfocitos T CD8⁺, pero no en CD4⁺ después de la primera dosis de RTS,S, y se reguló por incremento en tanto linfocitos T CD8⁺ como CD4⁺ después de la segunda dosis de RTS,S. "2sp1" se refiere a 2 semanas después de la primera dosis y "2sp2" se refiere a 2 semanas después de la segunda dosis.

La FIG. 5 muestra los títulos de IFAT de anticuerpos de voluntarios sensibilizados con ADN/reforzados con RTS,S. Los títulos de anticuerpos se presentaron como media geométrica $\pm$ EE (intervalos de confianza del 95 %) en voluntarios sensibilizados con ADN (+) y sin sensibilizar (-) con (+) y sin (-) anticuerpos para HBsAg antes de la primera dosis de RTS,S. Se realizaron ensayos con anticuerpos después de la 1^a y 2^a inmunizaciones con RTS,S. No hubo diferencias significativas en los títulos entre ninguno de los grupos, excepto que a las 2 semanas después de la primera dosis, los voluntarios ADN-/HBsAg+ tuvieron un título significativamente mayor que ADN+/HBsAg+ ($P < 0,02$).

Descripción detallada de la invención

Como se demuestra en el presente documento, una respuesta inmunitaria de múltiples brazos a la infección por malaria se sensibiliza inmunizando sujetos humanos con una vacuna de sensibilización que comprende un polinucleótido que codifica al menos un antígeno de la malaria y entonces se refuerza inmunizando con una vacuna de refuerzo que comprende al menos un polipéptido que comprende al menos un antígeno de la malaria que tiene al menos un epítopo en común con el antígeno de la malaria o antígenos de la vacuna de sensibilización. Sorprendentemente, el presente procedimiento de inmunización refuerza y amplía la respuesta sensibilizada, usando una vacuna de polipéptido.

Una "vacuna" es una composición de materia que comprende una molécula que, cuando se administra a un sujeto, induce una respuesta inmunitaria. Las vacunas pueden comprender moléculas de polinucleótidos, moléculas de polipéptido y moléculas de hidrato de carbono, además de derivados y combinaciones de cada uno, tal como glucoproteínas, lipoproteínas, conjugados de hidrato de carbono-proteína, fusiones entre dos o más polipéptidos o polinucleótidos, y similares. Una vacuna puede comprender además un diluyente, un adyuvante, un vehículo, o combinaciones de los mismos, como sería fácilmente entendido por aquellos expertos en la materia (83).

Cualquier procedimiento o vía de inoculación puede usarse solo o en combinación para administrar la vacuna de polinucleótido o la vacuna de proteína a un sujeto humano. Vías de administración incluyen intravenosa,

intramuscular, subcutánea, intradérmica o mucosa. Los medios de administración pueden variar, por ejemplo, puede inyectarse un ser humano por vía IV, IM, subcutánea, o vía ID. También puede inocularse un sujeto humano por vía mucosa. Alternativamente, la administración puede ser por un medio sin aguja, tal como usando una “pistola de genes” sin aguja, por ejemplo, Biojector® u otro dispositivo de inyección por chorro, o administración biolística. El polinucleótido puede administrarse en bacterias que comprenden el ADN de la vacuna de PfCSP, o virus que comprenden el ADN de la vacuna de PfCSP.

Ejemplos de vectores virales adecuados incluyen vectores del virus del herpes simple, vectores de la variolovacuna o de alfa-virus y retrovirus, que incluyen lentivirus, adenovirus y virus adeno-asociados. En una realización, estos vectores son vectores de virus defectuosos en la replicación - Las técnicas de transferencia génica que usan estos virus son conocidas para aquellos expertos en la materia. Pueden usarse vectores de retrovirus, por ejemplo, para integrar establemente el polinucleótido de la invención dentro del huésped genoma, aunque tal recombinación puede no ser aconsejable. Por el contrario, los vectores de adenovirus defectuosos en la replicación siguen siendo episómicos y, por tanto, permiten la expresión transitoria.

En una realización específica, el adenovirus usado como vector vivo es un adenovirus humano o simio defectuoso en la replicación. Normalmente, estos virus contienen una delección de E1 y pueden cultivarse en líneas celulares que se transforman con un gen E1. Adenovirus simios adecuados son, por ejemplo, virus aislados de chimpancé. Ejemplos de virus adecuados para su uso en la presente invención incluyen C68 (también conocido como Pan 9) (patente de EE.UU. N.º 6083 716) y Pan 5, 6 y Pan 7 (documento WO 03/046124). Así, estos vectores pueden manipularse para insertar un gen heterólogo de la invención de forma que el producto génico pueda expresarse. La formulación de uso y la fabricación de tales vectores adenovirales recombinantes se expone en detalle en el documento WO 03/046142.

Una vacuna puede estar comprendida de componentes separados. Como se usa en el presente documento, “componentes separados” se refiere a una situación en la que el término vacuna comprende en realidad dos vacunas discretas que van a administrarse por separado a un sujeto. En ese sentido, una vacuna que comprende componentes separados puede considerarse como un kit o un envase que comprende componentes de vacuna separados. Por ejemplo, en el contexto de la presente invención, un envase puede comprender un componente de vacuna de polinucleótido y un componente de vacuna de polipéptido.

Una vacuna “induce” una respuesta inmunitaria cuando el antígeno o antígenos presentes en la vacuna hacen que el sujeto vacunado genere una respuesta inmunitaria a ese antígeno o antígenos. El sujeto vacunado generará una respuesta inmunitaria, como se demuestra por la activación del sistema inmunitario, que incluye la producción de linfocitos T específicos de antígeno de vacuna, linfocitos B específicos de antígeno de vacuna, anticuerpos específicos de antígeno de vacuna y citocinas. La respuesta inmunitaria resultante puede medirse por varios procedimientos que incluyen ELISPOT, ELISA, ensayos de liberación de cromo, tinción intracelular de citocinas, análisis de FACS y tinción de tetrameros del MHC (para identificar células específicas de péptido). Un experto también puede usar estos procedimientos para medir una respuesta inmunitaria primaria o una respuesta inmunitaria secundaria.

Un “antígeno” es sustancia capaz de generar una respuesta inmunitaria en un sujeto expuesto al antígeno. Los antígenos son normalmente polipéptidos y son el centro de la respuesta inmunitaria del huésped. Un “epítope” o “determinante antigénico” es esa parte de un antígeno al que los linfocitos T y los anticuerpos se unen específicamente. Un antígeno puede contener múltiples epítopes.

La vacuna de sensibilización usada en la invención comprende un polinucleótido que codifica un antígeno de la malaria, tratado más adelante. La vacuna de sensibilización puede ser ADN solo o ADN que está bajo el control de un promotor extraño dentro de una bacteria o virus. El polinucleótido de la vacuna de sensibilización está presente en un vector de administración adecuado tal como un plásmido u otro vector tal como un vector bacteriano o viral. El polinucleótido puede estar bajo el control de un promotor adecuado tal como un promotor derivado del gen IE del HCMV. La vacuna de sensibilización se administra en una cantidad eficaz para sensibilizar una respuesta inmunitaria al antígeno de la malaria. Como se usa en el presente documento, la “sensibilización” de una respuesta inmunitaria se produce cuando un antígeno se presenta a linfocitos T o linfocitos B. Como resultado, las células sensibilizadas pueden responder al mismo antígeno otra vez como células de memoria en una segunda respuesta inmunitaria posterior. Así, la sensibilización genera tanto la respuesta inmunitaria primaria como establece memoria inmunológica. Un experto en esta técnica aprecia que una respuesta inmunitaria primaria representa la respuesta inmunitaria adaptativa tras la exposición inicial a un antígeno en un contexto particular tal como en el patógeno o en una vacuna. Sin embargo, también se apreciará que la invención no se limita al uso de la vacuna de sensibilización en el contexto de individuos inmunológicamente sin tratamiento previo. Más bien, la sensibilización también puede producirse en individuos que se han expuesto al antígeno, pero que no han recibido la vacuna de sensibilización.

Una dosificación de sensibilización “eficaz” puede oscilar entre 0,01 µg y 50 mg de ADN. Alternativamente, la dosificación puede estar entre 1 µg y 10 mg de ADN o 2,5 mg y 5 mg de ADN. La vacuna de polinucleótido puede administrarse una vez antes de la administración de la vacuna de polipéptido de refuerzo. En otra realización, la vacuna de sensibilización puede administrarse varias veces. Un número “eficaz” de inoculaciones puede oscilar entre 1 y 5 dosis. Alternativamente, el número de dosificación puede estar entre 1 y 3 dosis o 1 y 2 dosis antes de

administrar la vacuna de refuerzo.

“Polinucleótido” generalmente se refiere a cualquier polirribonucleótido (ARN) o polidesoxirribonucleótido (ADN), que puede ser ARN o ADN sin modificar o modificado. Los polinucleótidos incluyen, sin limitación, ADN monocatenario y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, ARN monocatenario y bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Los polinucleótidos también incluyen moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que puede ser monocatenario o, más normalmente, bicatenario o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Además, “polinucleótido” se refiere a regiones de tres cadenas que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Los polinucleótidos también incluyen ADN o ARN que contienen una o más bases modificadas y ADN o ARN con esqueletos modificados por estabilidad o por otros motivos. Bases “modificadas” incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases poco usuales tales como inosina. Puede hacerse una variedad de modificaciones al ADN y ARN; así, “polinucleótido” engloba formas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente modificadas de polinucleótidos como normalmente se encuentran en la naturaleza, además de las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células. Los oligonucleótidos son polinucleótidos relativamente cortos.

Un “fragmento” de una secuencia de polinucleótidos se refiere a una secuencia de polinucleótidos que es más corta que la secuencia de referencia, pero que retiene una función biológica o actividad que es reconocida por ser la misma que el polinucleótido de referencia. Un fragmento codifica al menos un epítipo del polipéptido de referencia codificado por la secuencia de polinucleótidos de referencia. Como se usa en el presente documento, “sustancialmente todo”, cuando se usa para describir un polinucleótido o polipéptido, se refiere a una molécula que, excepto por deleciones menores de bases de nucleótidos o restos de aminoácidos, codifica o representa el polinucleótido o polipéptido completo de longitud completa.

La vacuna de refuerzo usada en la invención puede comprender una proteína de fusión que comprende al menos un polipéptido de antígeno de la malaria, tratado más adelante. Los polipéptidos usados en esta vacuna pueden aislarse de una fuente natural, producida como una proteína recombinante en un organismo extraño tal como bacteria, o sintetizarse mediante medios químicos. La vacuna de refuerzo puede comprender además polipéptidos no palúdicos adicionales para potenciar la inmunogenicidad del polipéptido de la malaria. Por ejemplo, puede usarse parte o todo el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B. La vacuna de sensibilización y la vacuna de refuerzo comparten al menos un epítipo de la malaria común.

Una proteína de fusión adecuada para su uso en la vacuna de refuerzo según la invención puede comprender una proteína híbrida que comprende sustancialmente toda la porción del extremo C de la proteína CS, cuatro o más repeticiones en tándem de la región inmunodominante, y el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HbsAg). La proteína híbrida comprende una secuencia que contiene al menos 160 aminoácidos que es sustancialmente homóloga a la porción del extremo C de la proteína CS. En una realización, la proteína CS puede carecer de los 12 últimos aminoácidos del extremo C. Una proteína híbrida adecuada comprende, por ejemplo, una porción de la proteína CS de *P. falciparum* sustancialmente como se corresponde con los aminoácidos 210-398 de 7G8 de *P. falciparum* fusionados en marco mediante un conector lineal al extremo N de HbsAg. El conector puede comprender una porción de preS2 de HbsAg.

Otra realización es la partícula híbrida designada RTS,S que se describe en la patente de EE.UU. 5.928.902 y en la solicitud de patente internacional WO93/10152. Este híbrido comprende: 1.) un residuo de metionina, codificado por los nucleótidos 1059 a 1061, derivado de la secuencia del gen TDH3 de *Saccharomyces cerevisiae* (71); 2.) tres aminoácidos, Met Ala Pro, derivados de una secuencia de nucleótidos (1062 a 1070) creada por el procedimiento de clonación usado para construir el gen híbrido; 3.) un tramo de 189 aminoácidos, codificado por los nucleótidos 1071 a 1637 que representan los aminoácidos 210 a 398 de la proteína del circumsporozoito (CSP) de la cepa 7G8 de *Plasmodium falciparum* (21); 4.) un aminoácido (Arg) codificado por los nucleótidos 1638 a 1640, creado por el procedimiento de clonación usado para construir el gen híbrido; 5.) cuatro aminoácidos, Pro Val Thr Asn, codificados por los nucleótidos 1641 a 1652, y que representan los cuatro residuos del extremo carboxi de la proteína preS2 del virus de la hepatitis B (serotipo adw) (103); y 6.) un tramo de 226 aminoácidos, codificado por los nucleótidos 1653 a 2330, y que especifica la proteína S del virus de la hepatitis B (serotipo adw).

La vacuna de refuerzo se administra en una cantidad eficaz para “reforzar” una respuesta inmunitaria sensibilizada al antígeno de la malaria. Como se usa en el presente documento, “reforzar” una respuesta inmunitaria significa inducir una respuesta inmunitaria secundaria en un sujeto que ha sido sensibilizado (es decir, ya expuesto) por una exposición inicial a un antígeno. Una respuesta inmunitaria secundaria se caracteriza por la activación y expansión de linfocitos T y linfocitos B de memoria específica. Así, el reforzar una respuesta inmunitaria específica aumenta la respuesta inmunitaria sensibilizada induciendo a las células inmunitarias a proliferar y diferenciarse tras la posterior exposición a ese antígeno. Como se trata más adelante, la proteína CS de longitud completa de la vacuna de PfCSP contiene 9 epítopes de linfocito T mientras que RTS,S contiene 5 epítopes de linfocito T (61). Cuatro de los epítopes de RTS,S están presentes en la vacuna de PfCSP. Por ejemplo, cuando se administra, la vacuna de sensibilización sensibiliza linfocitos T CD8⁺ contra la malaria. La vacuna de refuerzo puede lograr uno o más de los siguientes efectos: induce linfocitos T CD4⁺, induce anticuerpos contra la malaria, refuerza la actividad de los linfocitos T CD8⁺ sensibilizados por la vacuna de sensibilización, e induce linfocitos T CD8⁺ adicionales no originalmente identificados en la respuesta inmunitaria inicialmente sensibilizada. La vacuna de refuerzo puede también inducir linfocitos T CD4⁺

e inducir anticuerpos contra la malaria. El reforzar una respuesta inmunitaria también se conoce en la técnica como “traer a la memoria” la respuesta inmunitaria.

Una dosificación de refuerzo “eficaz” puede oscilar entre 1 µg y 100 µg o entre 10 µg y 75 µg o entre 40 µg y 60 µg. En otra realización, la dosificación de refuerzo puede ser 50 µg. En otra realización más, la dosificación de refuerzo puede ser 25 µg. La vacuna de refuerzo puede administrarse una vez o múltiples veces. Un número “eficaz” de dosis de refuerzo puede oscilar entre 1 y 5 dosis de la vacuna de refuerzo. Alternativamente, el número de dosis puede estar entre 1 y 3 dosis o entre 1 y 2 dosis a un sujeto humano. En otra realización, tanto una vacuna de ADN como una vacuna de proteína pueden usarse para reforzar la respuesta inmunitaria primaria.

“Polipéptido” se refiere a cualquier polipéptido que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros de péptido. “Polipéptido” se refiere a tanto cadenas cortas, comúnmente denominadas péptidos, oligopéptidos u oligómeros, como a cadenas más largas, generalmente denominadas proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos distintos de aquellos normalmente codificados por un codón.

Los polipéptidos incluyen secuencias de aminoácidos modificadas tanto por procesos naturales, tales como después del procesamiento traduccional, como por técnicas de modificación química que son muy conocidas en la técnica. Tales modificaciones se han descrito bien en textos básicos y en monografías más detalladas, además de en una voluminosa bibliografía de investigación. Las modificaciones pueden producirse en cualquier parte en un polipéptido, que incluye el esqueleto del péptido, las cadenas laterales del aminoácido y los extremos amino o carboxilo. Tales modificaciones pueden estar presentes al mismo grado o a grados variables en varios sitios en un polipéptido dado.

Por tanto, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden ramificarse como resultado de ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de después de los procesos naturales de traducción o pueden prepararse por procedimientos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, biotilación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlace disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de anclajes de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a proteínas tales como arginilación, y ubiquitinación (79, 82, 94, 113).

Un “fragmento” de una secuencia de polipéptidos se refiere a una secuencia de polipéptidos que es más corta que la secuencia de referencia, pero que retiene una función biológica o actividad que es reconocida por ser la misma que la del polipéptido de referencia. Una actividad tal puede incluir, por ejemplo, la capacidad de estimular una respuesta inmunitaria. Un fragmento retiene al menos un epítipo del polipéptido de referencia. Una “porción” de un polipéptido se refiere a un subconjunto de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de referencia. Una porción puede describirse por su localización relativa en el polipéptido, por ejemplo, porción del extremo C o porción del extremo N.

La divulgación se refiere a cualquier antígeno de la malaria, tales como aquellos mostrados en la Tabla A y la Tabla B.

Tabla A

Antígenos pre-RBC	
ANTÍGENO	REFERENCIAS
CSP	13, 14, 29, 32, 41, 55 66, 69, 78, 85, 87, 91, 99, 114
SSP2	1, 13, 14, 29, 55, 56, 86, 104, 111, 112
Exp1/Hep-17	15, 16, 27, 28, 29
PfLSA1	29 y 44
PfLSA3	22

Tabla B

Antígenos de la etapa de RBC	
ANTÍGENO	REFERENCIAS
MSP-1	7, 10, 12, 20, 34, 35, 46, 58, 59, 65, 95, 96
MSP-2	3, 4, 17, 80, 81, 88
MSP-3	72 y 73
MSP-4	50
MSP-5	7
AMA1	5, 18, 19, 24, 25, 101, 102
Región II de EBA175	97 y 98
SERA	26, 48, 49, 76, 77
RAP2	39, 76, 84, 89

La “proteína del circumsporozoíto” o “CSP” es el principal polipéptido de superficie sobre la superficie de los esporozoítos de la malaria. Se ha clonado, secuenciado y expresado la CSP de la cepa 7G8 de *Plasmodium falciparum* (PfCSP) (21). También se han caracterizado otras CSP de otros parásitos de la malaria y están contenidos en la Tabla A.

“RTS,S”, como se usa en el presente documento, se refiere a un antígeno de la malaria particular y representa una realización de la presente invención. RTS,S y su producción se describen más completamente en la patente de Estados Unidos N.º 5.928.902 y la solicitud de patente internacional WO 93/10152.

“Ampliar” se refiere a aumentar el repertorio de respuestas de los linfocitos T. En este caso, un repertorio más ancho de linfocitos T productores de IFN- γ (Tc1 y Th1) se indujo por la sensibilización con ADN/refuerzo con RTS,S, ya que la inmunización/sensibilización con ADN inició tanto las respuestas de IFN- γ de tipo 1 CD8⁺ (Tc1) como de tipo 1 CD4⁺ (Th1) dependientes de linfocitos T CD4⁺, mientras que RTS,S solo indujo solo respuestas de IFN- γ Th1 dependientes de linfocitos T CD4⁺. Un experto puede detectar una respuesta inmunitaria más ancha usando ensayos de detección específicos de antígeno. Por ejemplo, un experto puede usar un ELISPOT, tinción de tetrámeros del MHC o ensayos de CTL de liberación de cromo para determinar el repertorio de linfocitos T.

“Ampliar” también se refiere a aumentar la gama de epítopes a la que reaccionará una respuesta inmunitaria. Además de las células inmunitarias inicialmente sensibilizadas, las células inmunitarias que fueron tanto no sensibilizadas como en un número tan pequeño que no fueron detectables, también son inducidas a expandirse y activarse. Así, una respuesta inmunitaria ampliada no solo amplifica la respuesta originalmente sensibilizada, también contiene respuestas a nuevos epítopes que no fueron una parte de la respuesta primaria. Un experto puede detectar una respuesta inmunitaria ampliada usando ensayos de detección específicos de antígeno. Por ejemplo, un experto puede usar un ELISPOT o tinción de tetrámeros del MHC para determinar el repertorio de epítopes a los que la respuesta inmunitaria primaria reacciona y comparar ese intervalo con el repertorio de epítopes a los que la respuesta inmunitaria secundaria reacciona. Si la respuesta inmunitaria secundaria reacciona a un mayor número de epítopes que la respuesta inmunitaria primaria, la respuesta inmunitaria secundaria ha sido ampliada.

“Linfocitos T CD8⁺” representan una clase de linfocitos T caracterizados por la posesión del marcador superficial celular CD8. Los linfocitos T CD8⁺ son “CTL” limitados a la clase I del MHC o “linfocitos T supresores”.

“Linfocitos T CD4⁺” representan una clase de linfocitos T caracterizados por la posesión del marcador superficial celular CD4. Los linfocitos T CD4⁺ son linfocitos T limitados a la clase II del MHC. Hay dos tipos de linfocitos T CD4⁺ denominados “linfocitos T cooperadores” de tipo 1 o tipo 2.

Como se trata anteriormente, se genera una respuesta inmunitaria a un antígeno mediante la interacción del antígeno con las células del sistema inmunitario. La respuesta inmunitaria resultante puede distinguirse ampliamente dentro de dos categorías extremas, que son respuestas inmunitarias humores o celulares (tradicionalmente caracterizadas por mecanismos efectores de anticuerpos y celulares de protección, respectivamente). Estas categorías de respuesta se han llamado respuestas de tipo Th1 (respuesta mediadas por célula) y respuestas inmunitarias de tipo Th2 (respuesta humoral). Las respuestas inmunitarias de tipo Th1 extremas pueden caracterizarse por la generación de respuestas específicas de antígeno, de CTL limitadas al haplotipo y de linfocitos citolíticos espontáneos. En ratones, las respuestas de tipo Th1 se caracterizan frecuentemente por la generación de

anticuerpos del subtipo IgG2a, mientras que en el ser humano éstas se corresponden con anticuerpos de tipo IgG1. Las respuestas inmunitarias de tipo Th2 se caracterizan por la generación de un amplio intervalo de isotipos de inmunoglobulina que incluyen en ratones IgG1, IgA e IgM.

La fuerza impulsora detrás del desarrollo de estos dos tipos de respuestas inmunitarias es las citocinas, varios mensajeros de proteína identificados que sirven para ayudar a las células del sistema inmunitario y conducir la eventual respuesta inmunitaria a tanto una respuesta Th1 como Th2. Así, altos niveles de citocinas de tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias celulares al antígeno dado, mientras que altos niveles de citocinas de tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias humores al antígeno. Es importante recordar que la distinción de respuestas inmunitarias de tipo Th1 y Th2 no es absoluta. En realidad, un individuo soportará una respuesta inmunitaria que se describe como que es predominantemente Th1 o predominantemente Th2. Sin embargo, frecuentemente es conveniente considerar las familias de citocinas en términos de aquellos descritos en clones de linfocitos T CD4⁺ murinos por Mosmann y Coffman (70). Tradicionalmente, las respuestas de tipo Th1 están asociadas a la producción de las citocinas INF- γ e IL-2 por linfocitos T. Otras citocinas frecuentemente directamente asociadas a la inducción de respuestas inmunitarias de tipo Th1 no se producen por linfocitos T, tales como IL-12. A diferencia, las respuestas de tipo Th2 están asociadas a la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y factor- β de necrosis tumoral (TNF- β).

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

En la formulación de vacunas para su uso en la invención, en el contexto del plásmido de P/CSP, un adyuvante puede o puede no administrarse. En el caso de RTS,S, la composición de adyuvante induce una respuesta Th1 preferencial. Además, se inducirán otras respuestas, que incluyen otras respuestas humores.

Ciertos adyuvantes de vacuna son particularmente adecuados para la estimulación de respuestas de citocinas de tipo Th1 o Th2. Tradicionalmente, los mejores indicadores del equilibrio Th1:Th2 de la respuesta inmunitaria después de una vacunación o infección incluyen medición directa de la producción de citocinas Th1 o Th2 por linfocitos T *in vitro* después de la re-estimulación con antígeno, y/o la medición de la relación IgG1:IgG2a de respuestas de anticuerpo específicas de antígeno. Así, un adyuvante de tipo Th1 es uno que estimula poblaciones de linfocitos T aisladas para producir altos niveles de citocinas de tipo Th1 cuando se re-estimulan con antígeno *in vitro*, e induce respuestas de inmunoglobulina específicas de antígeno asociadas a isotipo de tipo Th1. Por ejemplo, los inmunoestimulantes de tipo Th1 que pueden formularse para producir adyuvantes adecuados para su uso en la presente invención pueden incluir monofosforil lípido A, en particular monofosforil lípido A 3-de-O-acilado (3D-MPL). 3D-MPL es un adyuvante muy conocido fabricado por Ribi Immunochem, Montana. Químicamente, frecuentemente se suministra como una mezcla de monofosforil lípido A 3-de-O-acilado con tanto 4, 5 como 6 cadenas aciladas. Puede purificarse y prepararse por los procedimientos enseñados en el documento GB 2122204B, referencia que también desvela la preparación de difosforil lípido A, y variantes 3-O-desaciladas del mismo. Se han descrito otros lipopolisacáridos purificados y sintéticos (patente de EE.UU. 6.005.099, 42, 43, documentos EP 0 729 473 B1, EP 0 549 074 B1). En una realización, 3D-MPL está en forma de una formulación en partículas que tienen un tamaño de partícula pequeño inferior a 0,2 μ m de diámetro, y su procedimiento de fabricación se desvela en el documento EP 0 689 454.

Las saponinas son otro ejemplo de inmunoestimulantes de Th1 que pueden usarse con la invención. Las saponinas son adyuvantes muy conocidos (60). Por ejemplo, Quil A (derivada de la corteza del árbol sudamericano Quillaja Saponaria Molina), y fracciones de la misma, se describen en la patente de EE.UU. 5.057.540, EP 0 362 279 B1 y en Kensil (52). Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones purificadas por HPLC de Quil A) se han descrito como potentes adyuvantes sistémicos, y el procedimiento de su producción se desvela en la patente de EE.UU. 5.057.540 y el documento EP 0 362 279 B1. También se describe en estas referencias el uso de QS7 (una fracción no hemolítica de Quil-A) que actúa de potente adyuvante para vacunas sistémicas. El uso de QS21 se describe adicionalmente en Kensil *et al.* (51). También se conocen combinaciones de QS21 y polisorbato o ciclodextrina (documento WO 99/10008). Los sistemas de adyuvante en partículas que comprenden fracciones de QuilA, tales como QS21 y QS7, se describen en los documentos WO 96/33739 y WO 96/11711.

Otro ejemplo más de un inmunoestimulante es un oligonucleótido inmunoestimulante que contiene dinucleótidos CpG no metilados ("CpG"). CpG es una abreviatura de motivos de dinucleótidos de citosina-guanosina presentes en ADN. CpG se conoce en la técnica por ser un adyuvante cuando se administra por tanto vías sistémica como mucosa (documentos WO 96/02555, EP 468520, 23, 68). Históricamente, se observó que la fracción de ADN del bacilo de Calmette-Guerin (BCG) podría ejercer un efecto antitumoral. En estudios adicionales se mostró que oligonucleótidos sintéticos derivados de secuencias de genes de BCG eran capaces de inducir efectos inmunoestimulantes (tanto *in vitro* como *in vivo*). Los autores de estos estudios llegaron a la conclusión de que ciertas secuencias palindrómicas, que incluyen un motivo de CG central, llevaban esta actividad. La función central del motivo CG en la inmunoestimulación se aclaró después por Krieg (57). Un análisis detallado ha mostrado que el motivo CG tiene que estar en un cierto contexto de secuencia, y que tales secuencias son comunes en ADN bacteriano, pero son raras en ADN de vertebrado. La secuencia inmunoestimulante es frecuentemente: Purina,

Purina, C, G, pirimidina, pirimidina; en la que el motivo CG no está metilado, pero se sabe que otras secuencias de CpG sin metilar son inmunoestimulantes y pueden usarse en la presente invención.

En ciertas combinaciones de los seis nucleótidos puede estar presente una secuencia palindrómica. Varios de estos motivos, bien como repeticiones de un motivo o bien como una combinación de diferentes motivos, pueden estar presentes en el mismo oligonucleótido. La presencia de una o más de estas secuencias inmunoestimulantes que contienen oligonucleótidos puede activar diversos subconjuntos inmunes, que incluyen linfocitos citolíticos espontáneos (que producen interferón γ y tienen actividad citolítica) y macrófagos (Wooldrige et al., 1977). También se ha mostrado ahora que otras secuencias que contienen CpG no metiladas que no tienen esta secuencia consenso son inmunomoduladoras. Cuando se formula dentro de vacunas, CpG se administra generalmente en disolución libre junto con antígeno libre (documento WO 96/02555, 68) o covalentemente conjugado con un antígeno (documento WO 98/16247), o se formula con un vehículo tal como hidróxido de aluminio (antígeno de superficie de la hepatitis) (9, 23).

Tales inmunoestimulantes, como se han descrito anteriormente, pueden formularse junto con vehículos, tales como, por ejemplo, liposomas, emulsiones de aceite en agua y o sales metálicas, que incluyen sales de aluminio (tales como hidróxido de aluminio). Por ejemplo, 3D-MPL puede formularse con hidróxido de aluminio (documento EP 0 689 454) o emulsiones de aceite en agua (documento WO 95/17210); QS21 puede formularse ventajosamente con liposomas que contienen colesterol (documento WO 96/33739), emulsiones de aceite en agua (documento WO 95/17210) o alumbre (documento WO 98/15287); CpG puede formularse con alumbre (9, 23) o con otros vehículos catiónicos.

También pueden usarse combinaciones de inmunoestimulantes, tales como una combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina (documentos WO 94/00153; WO 95/17210; WO 96/33739; WO 98/56414; WO 98/05355, WO 99/12565; WO 99/11241) o una combinación de QS21 y 3D-MPL como se desvela en el documento WO 94/00153. Alternativamente, también puede usarse una combinación de CpG más una saponina tal como QS21 en la presente invención. Así, sistemas de adyuvante adecuados incluyen, por ejemplo, una combinación de monofosforil lípido A, tal como 3D-MPL, junto con una sal de aluminio. Otra realización combina un monofosforil lípido A y un derivado de saponina, tal como la combinación de QS21 y 3D-MPL como se desvela en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactogénica en la que QS21 se inactiva en liposomas que contienen colesterol (DQ) como se desvela en el documento WO 96/33739. Otra formulación de adyuvante más que implica a QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210. En otra realización, los oligonucleótidos de CpG se usan solos o junto con una sal de aluminio. Ejemplos de combinaciones de adyuvante y/o vehículo adicionales incluyen: 3D-MPL + QS21 en DQ; Alumbre + 3D-MPL; Alumbre + QS21 en DQ + 3D-MPL; Alumbre + CpG; 3D-MPL + QS21 en DQ + emulsión de aceite en agua; y CpG.

En otra realización, 3D-MPL y QS21 se combinan, con o sin CpG. La relación de QS21:3D-MPL puede estar en el orden de 1:10 a 10:1; 1:5 a 5:1; o 1:1. En una realización, la relación es 2,5:1 a 1:1 de D-MPL:QS21. Normalmente para administración humana, QS21 y 3D-MPL estarán presentes en una vacuna en el intervalo 1 μ g - 200 μ g, tal como 1-100 μ g, o 10 μ g - 50 μ g por dosis. Normalmente, el aceite en agua comprenderá del 2 al 10 % de escualeno, del 2 al 10 % de alfa-tocoferol y del 0,33 al 3 % de Tween 80. La relación de escualeno:alfa-tocoferol es igual o inferior a 1 ya que esto proporciona una emulsión más estable. Span 85 también puede estar presente a un nivel del 1 %. En algunos casos puede ser ventajoso que las vacunas de la presente invención contengan un estabilizador.

Los adyuvantes para su uso con la vacuna de polipéptido de refuerzo según la invención que comprende la proteína CS o un porción inmunogénica de la misma, opcionalmente en una proteína híbrida tal como RTS,S, pueden comprender una combinación de 3D-MPL y QS21 con o sin CpG.

Tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son a modo de ejemplo y explicativas solo y no son limitantes de la invención, como se reivindica. Además, la invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, ya que tales pueden, por supuesto, variar. Además, la terminología usada para describir realizaciones particulares no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención se limitará solo por sus reivindicaciones.

Con respecto a los intervalos de valores, la invención engloba cada valor intermedio entre los límites superior e inferior del intervalo a al menos un décimo de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente de otro modo. Además, la invención engloba cualquier otro valor intermedio establecido. Además, la invención también engloba intervalos que excluyen cualquiera o ambos de los límites superior e inferior del intervalo, a menos que se excluyan específicamente del intervalo establecido.

A menos que se defina de otro modo, los significados de todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento son aquellos comúnmente entendidos por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Un experto habitual en la materia también apreciará que cualquier procedimiento y material similar o equivalente a aquellos descritos en el presente documento también puede usarse para poner en práctica o probar la invención. Además, todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se incorporan por referencia.

Debe observarse que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referentes plurales, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. Así, por ejemplo, referencia a “un polipéptido objeto” incluye una pluralidad de tales polipéptidos y referencia a “el agente” incluye referencia a uno o más agentes y equivalentes del mismo conocidos para aquellos expertos en la materia, etc.

Además, todos los números que expresan cantidades de componentes, condiciones de reacción, % de pureza, longitudes de polipéptido y de polinucleótido, etc., usados en la memoria descriptiva y reivindicaciones, están modificados por el término “aproximadamente”, a menos que se indique lo contrario. Por consiguiente, los parámetros numéricos expuestos en la memoria descriptiva y reivindicaciones son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas de la presente invención. Por lo menos, y no como un intento por limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos en vista del número de dígitos significativos informados, aplicando técnicas de redondeo habituales. Sin embargo, los valores numéricos expuestos en los ejemplos específicos se informan tan precisos como sea posible. Cualquier valor numérico, sin embargo, contiene inherentemente ciertos errores de la desviación estándar de su medición experimental.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención. Son simplemente ilustrativos de la invención y desvelan diversas propiedades beneficiosas de ciertas realizaciones de la invención. Los siguientes ejemplos no deben interpretarse como limitantes de la invención.

EJEMPLO

Ejemplo 1

Refuerzo de la respuesta de anti-PfCSP sensibilizada con la vacuna de RTS,S

Se reclutaron veinticuatro voluntarios positivos para HLA-A*0201 para este estudio. La diversidad de HLA de los voluntarios se limitó al subtipo de clase I de HLA más común en esta población con el fin de permitir las comparaciones entre grupos de respuestas de linfocitos T genéticamente limitadas. Ninguno de estos voluntarios se había expuesto previamente a la malaria. De estos 24 individuos, 10 participaron en el segundo ensayo clínico de vacuna de PfCSP descrito anteriormente. Durante ese ensayo, estos voluntarios recibieron un total de tres dosis de la vacuna de ADN de PfCSP (VCL-2510, fabricada por Vical, Inc (San Diego, CA) como se describió previamente (62)), administrada como 2500 µg por dosis a intervalos de 4 semanas (62). Así, en este ensayo, estos 10 voluntarios recibieron su última dosis de la vacuna de ADN 12 a 14 meses antes de recibir la vacuna de RTS,S de refuerzo. Los catorce voluntarios restantes no habían recibido previamente la vacuna de ADN de PfCSP y así se usaron como controles no sensibilizados. Los 24 voluntarios fueron negativos para anticuerpos para PfCSP, VIH, antígeno central del VHB, VHC, virus de la variolovacuna y ADNbc antes de la inmunización con tanto la vacuna de ADN de PfCSP como la vacuna de RTS,S. Seis de los 10 voluntarios sensibilizados con ADN y 8 de los 14 controles no sensibilizados fueron positivos para anticuerpos para HBsAg.

Los 24 voluntarios recibieron dos inyecciones de vacuna de RTS,S a las 0 y 8 semanas mediante inyección intramuscular en el deltoide izquierdo. La vacuna de RTS,S contuvo los aminoácidos 207 a 395 de la proteína CSP de *Plasmodium falciparum* (NF54/3D7) fusionada con el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) (8). Brevemente, la proteína RTS,S es una proteína híbrida que comprende sustancialmente toda la porción del extremo C de la proteína CS, cuatro o más repeticiones al azar de la región inmunodominante y HBsAg. Para una descripción general de la preparación de RTS,S, véase el documento WO 93/10152 y la patente de EE.UU. 5.928.902, que se incorporan en el presente documento por referencia.

La proteína RTS,S recombinante resultante se expresó en levadura (99) y se combinó con los inmunoestimulantes monofosforil lípido A y QS21 en una emulsión de aceite en agua (Glaxo Smith Kline Inc, Rixensart, Bélgica) para preparar la vacuna de RTS,S. Específicamente, la formulación liofilizada contuvo un sedimento de RTS,S y un diluyente de adyuvante. El sedimento contuvo RTS,S (50 µg) y lactosa (3,15 %) como crioprotector. El diluyente de adyuvante contuvo MPL (50 µg), QS-21 (50 µg) y una emulsión de aceite/agua. Las formulaciones de vacuna resultantes contuvieron 50 µg de RTS,S en un volumen de 1 ml de emulsión y se prepararon 30 minutos antes de la inyección. Tres voluntarios de HLA no coincidente no recibieron la vacuna de ADN de PfCSP o vacuna de RTS,S. Las muestras de estos tres voluntarios se usaron como controles negativos en los ensayos. Un voluntario en el grupo no sensibilizado se retiró del estudio después de la primera inmunización.

Hubo varios epítopes de linfocitos T contenidos en la región en la dirección 5' de la secuencia de PfCSP de longitud completa, incluida en la vacuna de ADN de PfCSP, que no estaban presentes en la vacuna de RTS,S. Pero hubo suficiente solapamiento entre las dos vacunas para justificar administrar la vacuna de RTS,S como una posible vacuna de “refuerzo” a los voluntarios previamente inmunizados con la vacuna de ADN de PfCSP. Específicamente, RTS,S incluye una porción de PfCSP que contiene una región altamente conservada de 19 repeticiones NANP y el extremo carboxi de CSP fusionado con el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) co-expresado en levadura con HBsAg sin fusionar (36). La proteína CS de longitud completa de la vacuna de PfCSP contiene 9 epítopes de linfocitos T mientras que RTS,S contiene 5 epítopes de linfocitos T (61). Cuatro de los epítopes de

RTS,S están presentes en la vacuna de PfCSP.

Los Ejemplos 2-7 detallan los análisis que posteriormente se realizaron en muestras de sangre tomadas de cada uno de los voluntarios. Brevemente, se estudiaron las respuestas de linfocitos T 12-14 meses después de la última dosis de vacuna de ADN de PfCSP para aquellos voluntarios que recibieron la sensibilización con la vacuna de ADN de PfCSP y a las 1, 2 y 6 semanas después de la primera y segunda dosis de vacuna de RTS,S para todos los voluntarios. Los anticuerpos se probaron pre-inmunización y 2, 4, 6 y 8 semanas después de cada dosis de vacuna de RTS,S.

Ejemplo 2

Respuestas de CTL

Como se trata anteriormente, la inmunización con la vacuna de RTS,S solo induce respuestas de IFN- γ dependientes de anticuerpos y de linfocitos CD4⁺ en seres humanos, pero no se ha informado que provoque CTL específicos de antígeno en seres humanos (61). Para determinar si los CTL de memoria inducidos por ADN podrían ser traídos a la memoria reforzando con la vacuna de RTS,S y si la respuesta reforzada era más amplia que la respuesta sensibilizada con ADN original, se evaluó la actividad citotóxica de CTL específicos de antígeno en diferentes voluntarios. Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de la sangre de voluntarios sensibilizados con ADN o no sensibilizados 1-2 semanas antes de la inmunización con RTS,S, y 1 o 2 semanas después de la primera y/o segunda dosis de RTS,S. Estas CMSP se usaron entonces en un ensayo de liberación de cromo, que detecta la lisis de células diana presentadoras de antígeno (105).

Se realizaron ensayos de liberación de cromo *in vitro* como se describe previamente (105). Específicamente, para generar células efectoras, el 20 % de las CMSP totales se infectaron con ALVAC que expresa PfCSP (vCP182) a 5 ufp/célula durante 90 min a 37 °C. Después de lavar dos veces, estas CMSP se combinaron con las CMSP restantes, y se cultivaron durante 7-10 días. Se añadió IL-2 humana recombinante (Cetus, Emeryville, CA) después de 48 horas (20 U/ml). Las células diana fueron autólogas o blastos de PHA de MHC no coincidente que se sensibilizaron durante la noche con epítopes de CTL específicos de PfCSP o péptido de control a 10 μ g/ml. Se evaluó la actividad de CTL por un ensayo de liberación de cromo de 6 horas convencional. El porcentaje de lisis se definió como (liberación experimental - liberación de control de medio)/(liberación máxima - liberación de control de medio) x 100. El porcentaje de lisis específica se determinó restando el porcentaje de lisis de dianas cultivadas con el péptido limitado a gag A2 del VIH de control negativo del porcentaje de lisis de dianas incubadas con el péptido experimental. Las respuestas de CTL se consideraron positivas solo si el porcentaje de lisis específica después de la inmunización fue ≥ 10 % para al menos dos relaciones de efector:diana (E:T) en el mismo ensayo y si el porcentaje de lisis específica pre-inmunización fue < 10 %.

Se usaron péptidos sintéticos, al 90-95 % de pureza, para la sensibilización de dianas de CTL y se obtuvieron de Chiron Technologies (Clayton Victoria, Australia). Se usaron ocho péptidos derivados de PfCSP y se incluyeron en la secuencia de RTS,S. Estos ocho péptidos incluyeron 4 epítopes limitados a la clase I del MHC de CTL limitados, que tuvieron 9-10 aminoácidos de longitud. Los 4 epítopes de CTL estuvieron limitados por HLA-A*0201 (péptido A2.319; restos de aminoácidos 319-327, YLNKIQNSL; SEQ. ID. NO. 1), -A*0101 (péptido A1.310; residuos de a.a. 310-319, EPSDKHIKEY; SEQ. ID. NO. 2), -A*0301 (péptido A3/11.336; residuos de a.a. 336-345, VTCGNGIQVR; SEQ. ID. NO. 3) y -B*3501 (péptido B35.353; residuos de a.a. 353-360, KPKDELDY; SEQ. ID. NO. 4). Los otros cuatro péptidos fueron péptidos de unión a DR DR.316 (residuos de a.a. 316-335, IKEYLNKIQNSLSTEWSPCS; SEQ. ID. NO. 5), DR.318 (residuos de a.a. 318-332, EYLNKIQNSLSTEW; SEQ. ID. NO. 6), DR.363 (residuos de a.a. 363-383, DIEKKICKMEKCSSFVNVNS; SEQ. ID. NO. 7) y DR.346 (residuos de a.a. 346-365, IKPGSANKPKDEL DYANDIE; SEQ. ID. NO. 8), que tuvieron 15-20 aminoácidos de longitud como se describe previamente (107). Se proporcionaron un conjunto de 13 péptidos derivados de PfCSP y un conjunto de 20 péptidos derivados de HBsAg, 15 aminoácidos de longitud, por Glaxo Smith Kline Inc (Rixensart, Bélgica). Las secuencias de aminoácidos de los 13 péptidos de PfCSP fueron las siguientes: NEEP SDKHIKEYLNK (SEQ. ID. NO. 9), DKHIKEYLNKIQNSL (SEQ. ID. NO. 10), EYLNKIQNSLSTEW (SEQ. ID. NO. 11), IQNSLSTEWSPCSVT (SEQ. ID. NO. 12), STEWSPCSVTGNGI (SEQ. ID. NO. 13), PCSVTGNGIQVRIK (SEQ. ID. NO. 14), CGNGIQVRIKPGSAN (SEQ. ID. NO. 15), QVRIKPGSANKPKDE (SEQ. ID. NO. 16), PGSANKPKDEL DYEN (SEQ. ID. NO. 17), KPKDEL DYENDIEKK (SEQ. ID. NO. 18), LDYANDIEKKICKME (SEQ. ID. NO. 19), DIEKKICKMEKCSSFV (SEQ. ID. NO. 20) y ICKMEKCSSFVNVN (SEQ. ID. NO. 21). Los péptidos derivados de la proteína de matriz de la gripe (residuo 58-66, GILGFVFTL, HLA-A2.1; SEQ. ID. NO. 22), o epítipo T colaborador P30 universal de la toxina del tétanos (residuo 947-969, FNNFTVSFVLRVPKVSASHLET, limitado a DR y DP; SEQ. ID. NO. 23) se usaron como controles positivos (74). Los péptidos de la proteína gag del VIH (residuo 77-85, SLYNTVATL, limitado a HLA-A2.1; SEQ. ID. NO. 24), o proteína de *P. falciparum*, Exp-1 (residuo 82-96, secuencia AGLLGNVSTVLLGGV, limitado a DR; SEQ. ID. NO. 25) se usaron como controles negativos.

Traer a la memoria CTL de memoria inducidos por ADN por refuerzo con RTS,S

No se detectaron CTL en voluntarios sensibilizados con ADN o no sensibilizados inmediatamente antes de la administración de la vacuna de RTS,S. No se detectaron respuestas de CTL en ninguno de los 14 voluntarios no sensibilizados que recibieron la vacuna de RTS,S sola. Se detectaron respuestas de CTL específicas de antígeno y

genéticamente limitadas en 5/10 voluntarios sensibilizados con ADN (Fig. 1c). Uno de 5 respondedores tuvo CTL (V6) una semana después de la primera dosis, y los otros tuvieron CTL después de la segunda dosis de RTS,S. La frecuencia de respuestas de CTL (7/113 ensayos, 6,2 %) fue significativamente mayor en los voluntarios sensibilizados con ADN ($P = 0,0047$) en comparación con no sensibilizados (0/125 ensayos, 0 %). La frecuencia de respuestas de CTL fue comparable a la observada después de la inmunización con ADN sola entre los 15 voluntarios que recibieron 3 dosis de vacuna de ADN de PfCSP 12-14 meses previamente (30/458 ensayos, 6,6 %) (107).

La magnitud de CTL en los voluntarios que se habían sensibilizado con ADN y reforzado con RTS,S (intervalo de porcentaje de lisis específica [media geométrica]: 11,4-28,1 [15,4]) también estuvo en el mismo intervalo que la inducida por inmunización con ADN sola (10,5-90,0 [15,6]). La vacuna de RTS,S no contuvo los epítopes de linfocitos T Cod8+ asociados a la mayor prevalencia de respuesta en dos estudios previos (105, 107).

Se detectaron respuestas de CTL a los 4 epítopes limitados a la clase I del MHC específicos de PfCSP definidos, presentes en la secuencia de RTS,S. De los 5 respondedores positivos para CTL, 4 tuvieron CTL para el epítope limitado a HLA-A2 A2.319, uno respondió al epítope limitado a HLA-A1 A1.310 (V2) y 2/4 respondedores a A2.319 también respondieron a los epítopes limitados a HLA-A3 y HLA-B7, A3.336 (V8) y B7.285 (V9) respectivamente. No hubo CTL detectables dirigidos contra el epítope de CTL CD4⁺ informado DR.318 (secuencia EYLNKIQNSLSTEWSS; SEQ. ID. NO. 26) que contiene el epítope de CTL CD8⁺ A2.319 (subrayado) (69). Tampoco hubo actividad de CTL detectable en los 14 voluntarios que no habían recibido ADN de PfCSP, pero que recibieron 2 dosis de la vacuna de RTS,S. La falta de actividad de CTL en estos voluntarios está de acuerdo con estudios previos que mostraron que esta vacuna sola era incapaz de inducir actividad de linfocitos T Cod8+ (es decir, actividad de CTL).

Entre los 5 voluntarios sensibilizados con ADN que tuvieron respuestas de CTL positivas después de reforzar con la vacuna de RTS,S, 3 no tuvieron actividad de CTL previamente detectable contra los mismos epítopes cuando se probaron 2 y 6 semanas después de la segunda y tercera dosis de inmunización con ADN de PfCSP (107), aproximadamente un año antes del refuerzo con RTS,S. A diferencia, dos de los cinco voluntarios tuvieron previamente actividad de CTL detectable contra péptidos incluidos dentro de RTS,S después de la inmunización con ADN sola. Estos dos voluntarios no respondieron al refuerzo con RTS,S.

Las respuestas de CTL reforzadas con RTS,S son más amplias que las respuestas de CTL sensibilizadas con ADN

De los 5 voluntarios sensibilizados con ADN que tuvieron respuestas de CTL positivas después de reforzar con la vacuna de RTS,S, tres de ellos (V3, V6 y V8) respondieron a epítopes después del refuerzo con RTS,S que no habían respondido después de la sensibilización con ADN. Específicamente, las respuestas de CTL se consideraron positivas solo si el porcentaje de lisis específica después de la inmunización fue ≥ 10 % con respecto a los antecedenentes de ambos controles negativos (control MHC+ y péptido no MHC). En V3 y V6, no hubo respuesta de CTL al epítope A2.319 después de la sensibilización con ADN con la vacuna de PfCSP (Figs. 1a y 1b). Después de reforzar con RTS,S, sin embargo, ambos voluntarios mostraron una respuesta de CTL a este epítope (Fig. 1c). V8 no tuvo respuestas de CTL a los epítopes A2.319 y A3.336 después de la sensibilización con ADN, ya después de reforzar este voluntario sensibilizado con la vacuna de RTS,S, aparecieron las respuestas de CTL a estos epítopes (Figs. 1a, 1b, y 1c).

Como se trata anteriormente, aquellos expertos en la materia no consideraron que las vacunas basadas en proteína fueran eficaces en estimular respuestas de CTL. Asimismo, RTS,S, una vacuna basada en proteína, se consideró hasta la fecha ineficaz en estimular las respuestas de linfocitos T CD8⁺ (61). A diferencia de lo que se sabía, los datos anteriores demuestran claramente que después de la sensibilización con ADN, RTS,S puede estimular respuestas de CTL a nuevos epítopes de CTL.

La frecuencia y magnitud de las respuestas de IFN- γ específicas de péptido (más adelante) y de CTL se analizaron usando la prueba de la chi al cuadrado, la prueba exacta de Fisher (bilateral) o la prueba de la t de Student (bilateral). La prueba de la t para muestras emparejadas se usó para comparar la proporción de niveles de expresión de ARNm de IFN- γ en subpoblaciones de linfocitos T. El nivel de significancia fue un valor de $p < 0,05$.

Ejemplo 3

Respuestas de IFN- γ de linfocitos T a PfCSP

Se evaluaron las respuestas de IFN- γ por ensayos de ELISPOT estándar del siguiente modo. Se determinó el número de células productoras de IFN- γ específicas de PfCSP por ELISPOT después de 36 h de estimulación *in vitro* en presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de péptidos como se describió previamente (107). Se enumeraron el número de manchas correspondientes a las células productoras de citocinas en pocillos (células formadoras de manchas; CFM) con un sistema de recuento de manchas automatizado (Scanalytics, Fairfax, VA). Las respuestas se expresaron como el número medio de CFM/10⁶ CMSP, y se consideraron significativas si 1) el número medio de células en pocillos con péptido experimental era significativamente mayor ($p < 0,05$, prueba de la t de Student) que en pocillos con péptido de control; 2) las CFM netas/pocillo (CFM media en pocillos de péptido experimental menos la media de CFM en pocillos de péptido de control) era ≥ 5 CFM/pocillo; y 3) el índice de estimulación (la relación de la media de CFM en pocillos de péptido experimental con respecto a la media de CFM en pocillos de péptido de control) era

superior a 2,0. Además, si las células obtenidas antes de la inmunización tuvieron una respuesta positiva a un péptido específico de *PfCSP* como se ha definido anteriormente, la respuesta al mismo péptido después de la inmunización no se consideró positiva.

Como se usa en el presente documento, la “frecuencia de respondedores positivos” en un ELISPOT de IFN- γ es el número de voluntarios que dan positivo para un péptido particular dividido entre el número total de voluntarios en el grupo de prueba. La “frecuencia de ensayos de ELISPOT de IFN- γ positivos” es el número de reacciones positivas para un péptido dividido entre el número total de pruebas realizadas en ese péptido. Por ejemplo, si se prueban 6 péptidos en cada uno de 10 voluntarios, el número total de pruebas es 60. Si 36 de aquellas pruebas son positivas, entonces la frecuencia de ensayos positivos es 36 de 60. La “magnitud de una respuesta de IFN- γ ” se indica por el número de CFM por millón de CMSP.

Se usaron CMSP, aisladas 1-2 semanas antes de, y 1, 2 y 6 semanas después, de la primera y segunda dosis de la vacuna de RTS,S en el ensayo de ELISPOT. En estos ensayos, las CMSP se incubaron con 8 péptidos de *PfCSP* definidos, como se trata en el Ejemplo 2 (cuatro péptidos de 9 aminoácido que contienen epítopes limitados a la clase I de HLA y cuatro péptidos de 15-20 aminoácido, cada uno de los cuales incluyó un epítope limitado a la clase II, y tres de los cuales también contuvieron un epítope limitado a la clase I) y un conjunto de 13 péptidos de *PfCSP* que están incluidos en la secuencia de RTS,S. Estos péptidos también se tratan en más detalle en el Ejemplo 2 anterior.

Voluntarios sensibilizados con ADN o no sensibilizados no tuvieron respuestas de IFN- γ específicas de *PfCSP* detectables antes de la inmunización con RTS,S. No se detectaron respuestas de IFN- γ en ningún momento después de la inmunización en ensayos usando solo los péptidos de 9 aminoácido que tienen que contienen solo epítopes limitados a la clase I del MHC. Éstos son los mismos péptidos tratados en el Ejemplo 2. Después de la primera dosis, las respuestas de IFN- γ positivas se detectaron en los cuatro péptidos de *PfCSP* de 15-20 aminoácidos en 6 de los 10 voluntarios sensibilizados con ADN en comparación con un péptido tal en 2 de los 14 voluntarios no sensibilizados ($p = 0,019$) (Tabla 1). Los respondedores positivos son aquellos que respondieron al menos a uno de los cuatro péptidos. Además, los respondedores en el grupo sensibilizado respondieron a los cuatro péptidos probados, mientras que los respondedores en el grupo no sensibilizado respondieron a solo uno de los cuatro péptidos probados. La frecuencia de respuestas fue significativamente mayor en voluntarios sensibilizados con ADN en comparación con no sensibilizados (ensayos positivos / ensayos totales: 20/116 [18,1 %] frente a 4/164 [2,4 %], $p = 0,00001$) independientemente del estado de Ab para HBsAg del individuo (Tabla 1).

Tabla 1 Frecuencia global y magnitud de respuestas de IFN- γ a péptidos específicos de P1CSP

Grupo	Número de respondedores / número probado		Número de ensayos positivos / ensayos totales (%)		Intervalo de CFM netas/10 ⁶ CMSP (media geométrica)	
	Voluntarios sensibilizados con ADN	Voluntarios no sensibilizados	Voluntarios sensibilizados con ADN	Voluntarios no sensibilizados	Voluntarios sensibilizados con ADN	Voluntarios no sensibilizados
<u>Después de la primera inmunización</u>						
HBsAg(+)	4/6 (66,7)	2/8 (25,0)	13/69 (18,8)	4/95 (4,2)	13,1-105,5 (38,5)	20,0-63,1 (39,6)
HBsAg(-)	2/4 (50,0)	0/6 (0)	7/47 (14,9)	0/9 (0)	13,8-82,5 (32,7)	neg
Total	6/10 (60,0)*	2/14 (14,3)*	20/116 (18,1)	4/164 (2,4)	13,1-105,5 (36,3)	20,0-63,1 (39,6)
<u>Después de la segunda inmunización</u>						
HBsAg(+)	5/6 (83,0)	6/8 (75,0)	23/72 (31,9)	11/84 (13,1)	11,9-82,5 (32,1)	14,4-96,9 (37,8)
HbsAg(-)	3/4 (75,0)	6/6 (100,0)	18/48 (37,5)	29/72 (40,3)	11,7-122,5 (33,4)	17,5-125,6 (41,0)
Total	8/10 (80,0)	11/14 (84,6)	41/120 (34,2)	40/156 (25,6)	11,7-122,5 (32,6)	14,4-125,6 (39,6)
<u>Global</u>						
HBsAg(+)	5/6 (83,0)	6/8 (75,0)	36/141 (25,5)	15/179 (8,4)	11,9-105,0 (34,3)	14,4-96,9 (38,1)
HBsAg (-)	3/4 (75,0)	6/6 (100,0)	25/95 (26,3)	29/141 (20,6)	11,7-122,5 (33,2)	17,5-125,6 (41,0)
Total	8/10 (80,0)	11/14 (84,6)	61/238 (25,6)	44/320 (13,8)	11,7-122,5 (33,9)	14,4-125,6 (39,57)

* después de la primera inmunización, el número de respondedores positivos en voluntarios sensibilizados con ADN fue significativamente superior a aquél en voluntarios no sensibilizados (6/10 frente a 2/14, p=0,019)

Después de la segunda dosis de la vacuna de RTS,S, las respuestas de IFN- γ se detectaron en 8 de los 10 voluntarios sensibilizados con ADN y en 11 de los 14 voluntarios no sensibilizados (Tabla 1). Aunque no hubo diferencia entre los dos grupos en términos del número de respondedores después de la segunda dosis de la vacuna de RTS,S (véase el número de ensayos positivos/ensayos totales (%)), hubo un mayor número estadísticamente significativo de ensayos positivos globales entre los voluntarios sensibilizados con ADN en comparación con los no sensibilizados (ensayos positivos/ensayos totales, 61/238 [25,6 %] frente a 44/320 [13,8 %], $p = 0,0004$) (Tabla 1). Esta diferencia en los números de ensayos positivos globales estuvo directamente relacionada con el estado del anticuerpo para HbSAg de los voluntarios como se demuestra por la frecuencia de ensayos positivos. El número de ensayos positivos fue significativamente mayor en voluntarios sensibilizados con ADN que en no sensibilizados entre individuos positivos para anticuerpos para HBsAg (23/72 [31,9 %] frente a 11/84 [13,1 %], $p = 0,0078$), pero no en individuos negativos para anticuerpos para HbsAg (37,5 % frente al 40,3 % de ensayos positivos) después de la segunda inmunización con RTS,S.

Al nivel de epítipo, las respuestas de IFN- γ contra los péptidos DR.316, DR.318 y DR.363 se compararon entre los grupos sensibilizados con ADN y no sensibilizados. DR.316 y DR.318 contienen epítopos de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ que se solapan, mientras que DR.363 solo contiene un epítipo de linfocito T CD4⁺ (107).

Como se expone en la Tabla 2, las respuestas de IFN- γ contra el péptido DR.316 se detectaron en 4 de los 10 voluntarios sensibilizados con ADN en comparación con 0 de los 14 no sensibilizados después de la primera dosis de la vacuna de RTS,S ($p = 0,0095$), y en 6 de los 10 voluntarios sensibilizados con ADN en comparación con 5 de los 13 no sensibilizados después de la primera y segunda dosis de la vacuna de RTS,S ($p = 0,35$). Cuando todos los ensayos se consideraron en general (después de la primera y segunda dosis de la vacuna de RTS,S), el grupo sensibilizado con ADN tuvo una mayor frecuencia de ensayos positivos (ensayos positivos/ensayos totales, 17/60 frente a 8/81, $p = 0,0046$), pero no hubo diferencia en la magnitud de respuestas de IFN- γ (intervalo de CFM: 11,9-106,3 [33,0] frente a 17,5-58,1 [28,4], $p = 0,21$).

Tabla 2 Frecuencia de respuestas de IFN- γ contra PfCSP al nivel de epítipo

Grupo		Número de respondedores/número probado (%)			Número de ensayos positivos/ensayos totales (%)		
		DR.316	DR.318	DR.363	DR.316	DR.318	DR.363
<u>Después de primera inmunización</u>							
Sensibilizados	con	4/10 (40)	3/10 (30,0)	3/10 (30,0)	6/30 (20,0)	4/30 (13,3)	4/30 (13,3)
No sensibilizados		0/14 (0)	0/14 (0)	2/14 (14,3)	0/42 (0)	0/42 (0)	2/42 (4,8)
Valor de p		0,0095	0,028	0,35	0,0025	0,015	0,195
<u>Después de la segunda inmunización</u>							
Sensibilizados	con	5/10 (50,0)	6/10 (60)	2/10 (20)	11/30 (36,7)	10/30 (33,3)	4/30 (13,3)
No sensibilizados		5/13 (38,5)	1/13 (7,7)	7/13 (54)	8/39 (20,5)	1/39 (20,5)	16/39 (41,0)
Valor de p		0,58	0,0069	0,099	0,136	0,00054	0,012
<u>Global</u>							
Sensibilizados	con	6/10 (60)	6/10 (60)	4/10 (40)	17/60 (28,3)	14/60 (23,3)	8/60 (13,3)
No sensibilizados		5/13 (38,5)	1/13 (7,7)	9/14 (64)	8/81 (9,9)	1/81 (1,2)	18/81 (22,2)
Valor de p		0,35	0,0069	0,24	0,0046	< 0,00003	0,178

Por tanto, como se muestra en la Tabla 2, las respuestas de IFN- γ contra el péptido DR.318, que no contiene los dos primeros aminoácidos del péptido DR.316, se detectaron en 3 de los 10 voluntarios sensibilizados con ADN en comparación con 0 de los 14 no sensibilizados después de la primera dosis de la vacuna de RTS,S ($p=0,028$), y en 6 de los 10 voluntarios sensibilizados con ADN en comparación con 1 de los 13 no sensibilizados después de la primera y segunda dosis de la vacuna de RTS,S ($p = 0,0069$). Los ensayos de ELISPOT realizados después de la primera y segunda dosis de la vacuna de RTS,S mostraron en general que el grupo sensibilizado con ADN tuvo una mayor frecuencia de ensayos positivos (ensayos positivos/ensayos totales, 14/60 frente a 1/81, $p < 0,00003$). Dado

que hubo solo una única respuesta a este péptido en el grupo que solo recibió la vacuna de RTS,S, fue imposible comparar la magnitud de las respuestas.

Se detectaron respuestas de IFN- γ contra el péptido DR.363, que no contiene un epítipo de linfocito T CD8⁺ conocido, en 3 de los 10 voluntarios sensibilizados con ADN en comparación con 2 de los 14 no sensibilizados después de la primera dosis de la vacuna de RTS,S ($p=0,35$), y en 4 de los 10 voluntarios sensibilizados con ADN en comparación con 9 de los 14 no sensibilizados en general después de la primera y segunda dosis de la vacuna de RTS,S ($p=0,24$) (Tabla 2). Los ensayos hechos después de la primera y segunda dosis de la vacuna de RTS,S no mostraron diferencia significativa entre el grupo sensibilizado con ADN y el grupo de RTS,S solo en la frecuencia de ensayos positivos (ensayos positivos/ensayos totales, 8/60 frente a 18/81, $p=0,178$). Pero hubo una magnitud significativamente mayor de las respuestas de IFN- γ en voluntarios no sensibilizados en comparación con sensibilizados con ADN después de la segunda dosis de RTS,S (intervalo de CFM: 13,1-58,8 [26,4 media geométrica] por 10^6 células frente a 14,0-140,6 [47,9 media geométrica] por 10^6 células, $p=0,004$).

Similarmente, después de dos dosis de la vacuna de RTS,S, no hubo diferencia en la frecuencia de individuos de respuesta positiva entre el grupo sensibilizado con ADN y el grupo de RTS,S solo (8/10 frente a 11/13). Véase la Tabla 1. Los individuos en el grupo sensibilizado con ADN respondieron a significativamente más de los péptidos probados que los voluntarios que solo recibieron la vacuna de RTS,S. De los 8 respondedores en los 10 voluntarios sensibilizados con ADN, uno tuvo respuestas contra los cuatro péptidos de 15-20 aminoácidos probados, uno respondió a tres péptidos, 5 a dos péptidos, y solo uno respondió a un péptido. De los 11 respondedores en los 13 voluntarios no sensibilizados, uno respondió a 3 péptidos, dos respondieron a 2 péptidos y ocho respondieron a solo un péptido (2/8 respondieron a DR.316 y 6/8 respondieron a DR.363). En general, 7 de los 8 voluntarios sensibilizados con ADN en comparación con 3 de los 11 no sensibilizados respondieron a al menos dos péptidos probados ($p=0,0094$).

Ejemplo 4

Respuestas de IFN- γ de linfocitos T a HBsAg

RTS,S es una proteína de fusión de parte de PfCSP y el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg). La inmunización con RTS,S en adyuvante fue significativamente menos eficaz en inducir respuestas de linfocitos T entre individuos con anticuerpos para HBsAg. Este efecto fue mucho menos pronunciado en voluntarios sensibilizados con ADN. Debido a la influencia observada en el estado de anticuerpos para HBsAg en respuesta a los cuatro péptidos de 15-20 aminoácidos, los presentes inventores ampliaron los estudios. Se compararon las respuestas de IFN- γ a PfCSP y HBsAg realizando ensayos de ELISPOT como se ha descrito anteriormente con un conjunto de 13 péptidos de PfCSP (pPfCSP) y un conjunto 19 péptidos de HBsAg simultáneamente en CMSP en todos los momentos de tiempo del estudio después de la primera y segunda inmunización con RTS,S. En individuos no sensibilizados con ADN sin tratamiento previo, el componente de HBsAg fue inmunodominante para respuestas de linfocitos T (compárense 0/6 respondedores para PfCSP con 6/6 respondedores para HBsAg para voluntarios no sensibilizados negativos para HBsAg y 1/8 respondedores para PfCSP con 7/8 respondedores para HBsAg para voluntarios no sensibilizados positivos para HBsAg), pero la sensibilización con ADN de PfCSP pareció equilibrar esta inmunodominancia dirigiendo respuestas de linfocitos T hacia PfCSP (Tabla 3; compárense 2/4 respondedores para PfCSP con 2/4 respondedores para HBsAg para voluntarios sensibilizados negativos para HBsAg y 4/6 respondedores para PfCSP con 6/6 respondedores para HBsAg para voluntarios sensibilizados positivos para HBsAg).

Tabla 3 Frecuencia y magnitud de respuestas de IFN-γ entre voluntarios seropositivos y seronegativos para HBsAg

Respuesta de un conjunto de péptidos	Voluntarios sensibilizados con ADN			Voluntarios no sensibilizados		
	HBsAg(+)	HBsAg(-)	Valor de p	HBsAg(+)	HBsAg(-)	Valor de p
Frecuencia [respondedores positivos/voluntarios totales (%)]						
<u>Después de la primera inmunización</u>						
pFCSP	4/6 (66,7)	2/4 (50,4)	0,6	1/8 (12,5)	0/6 (0)	0,37
pHBsAg	6/6 (100,0)	2/4 (50,0)	0,05	7/8 (87,5)	6/6 (100,0)	0,37
Valor de p	0,12	1,00		0,003	0,0005	
<u>Después de la segunda inmunización</u>						
pFCSP	5/6 (83,0)	3/4 (75,0)	0,75	3/7 (42,9)	5/6 (83,0)	0,14
pHBsAg	5/6 (83,0)	3/4 (75,0)	0,75	7/7 (100,0)	6/6 (100,0)	-
Valor de p	1,00	1,00		0,018	0,3	
Frecuencia de ensayos positivos/ensayos totales (%)						
<u>Después de la primera inmunización</u>						
pFCSP	4/15 (26,7)	2/11 (18,2)	0,61	2/23 (8,7)	0/15 (0)	-
pHBsAg	12/5 (80,0)	3/11 (27,3)	0,007	16/23 (69,6)	9/15 (60,0)*	0,54
Valor de p	0,0034	0,61		0,00002	-	
<u>Después de la segunda inmunización</u>						
pFCSP	9/18 (50)	7/12 (58,3)	0,65	3/21 (14,3)	12/18 (66,7)	0,0008
pHBsAg	12/18 (66,7)	7/12 (58,3)	0,64	16/21 (76,2)	17/18 (94,4)*	0,12
Valor de p	0,31	1,00		0,00006	0,035	
Magnitud [CFM netas/10° CMSP (media geométrica)]						
<u>Después de la primera inmunización</u>						
pFCSP	19,5-52,2 (33,7)	53,1-82,5 (66,2)	0,23	33,6-54,4 (44,0)	neg	-
pHBsAg	13,5-80,0 (37,7)	21,3-144,4 (46,0)	0,54	13,1-222,9 (60,1)	13,1-132,5 (33,9)*	0,013
Valor de p	0,41	0,78		0,052	-	
<u>Después de la segunda inmunización</u>						
pFCSP	18,1-68,8 (33,8)	11,7-122,5 (37,9)	0,11	25,0-54,4 (37,6)	17,5-125,6 (46,1)	0,09
pHBsAg	18,8-131,3 (52,8)	17,9-215,0 (57,6)	0,34	20,0-278,8 (62,3)	12,5-317,5 (97,3)*	0,013
Valor de p	0,024	0,29		0,0032	0,0001	

* Tanto la frecuencia como la magnitud de respuestas de IFN-γ contra HBsAg en voluntarios seronegativos para HBsAg del grupo no sensibilizado aumentó significativamente después de la segunda inmunización en comparación con después de la primera inmunización en comparación con después de la primera inmunización y valores de p = 0,035 y 0,00003 respectivamente.

En voluntarios no sensibilizados, las respuestas de IFN- γ a HBsAg fueron altas en todos los individuos independientemente de si tenían o no anticuerpos para HBsAg (Tablas 3 y 4; véase voluntarios no sensibilizados). Como se muestra en la Tabla 3, después de la primera dosis de la vacuna de RTS,S, la magnitud de las respuestas al conjunto de péptidos de HbsAg fue significativamente mayor en individuos con anticuerpos preexistentes para HBsAg que en aquellos sin tales anticuerpos (intervalo de CFM/10⁶ CMSP [media geométrica]: 13,1-222,9 [60,1] frente a 13,1-132,5 [33,9], $p = 0,013$). Después de la segunda inmunización con la vacuna de RTS,S, sin embargo, no hubo diferencia en la magnitud de IFN- γ entre los dos grupos (véanse los datos de magnitud). Las respuestas a HBsAg en individuos negativos para anticuerpos para HBsAg aumentaron significativamente después de la segunda dosis de la vacuna de RTS,S en comparación con después de la primera dosis (Tabla 3). Específicamente, la frecuencia de ensayos positivos después de dos dosis de la vacuna de RTS,S fue 17/18 en comparación con 9/15 después de la primera dosis ($p = 0,035$) (véase la nota a pie de página de la Tabla 3). La magnitud de la respuesta de IFN- γ fue 12,5-317,5 [media geométrica = 97,3] en comparación con 13,1-132,5 [media geométrica = 533,9] con solo una dosis ($p = 0,024$) (véase la nota a pie de página de la Tabla 3). Después de la segunda dosis, los números de CFM fueron significativamente mayores en individuos negativos para anticuerpos para HBsAg que en individuos positivos para anticuerpos para HBsAg (12,5-317,5 [97,3] en comparación con 20,0-278,8 [62,3], $p = 0,013$) (Tabla 3).

Como proporciona la Tabla 3, las respuestas de IFN- γ a P α CSP mostraron un patrón diferente de las respuestas a HBsAg. Trece de los catorce voluntarios no sensibilizados respondieron a HBsAg después de una dosis de la vacuna de RTS,S, como se muestra en 7 de los 8 voluntarios positivos para HBsAg y en los 6 voluntarios negativos para HBsAg. A diferencia, solo uno de estos 14 individuos respondió a P α CSP ($p = 0,0049$), como se muestra en 1 de los 8 de voluntarios positivos para HBsAg y 0 de los 6 voluntarios negativos para HBsAg. En general, las respuestas de IFN- γ inducidas por RTS,S fueron significativamente menores a P α CSP que a HBsAg en todos los voluntarios que no fueron sensibilizados con ADN, e incluso menores en individuos con anticuerpos anti-HBsAg preexistentes (Tabla 3), como se mide por la frecuencia de respondedores positivos y ensayos positivos después de la primera y segunda dosis de RTS,S. Véanse los valores de p para los voluntarios no sensibilizados. Asimismo, la magnitud de las respuestas de IFN- γ fue menor después de cada inmunización en tanto individuos positivos para anticuerpos HBsAg ($p < 0,05$ -0,0032) como individuos negativos para el anticuerpo ($p = 0,0001$) (Tabla 3). Véanse los valores de p marcados en la sección de magnitud de la Tabla 3. Estos datos demostraron que, en individuos no sensibilizados, RTS,S provocó respuestas de linfocitos T a P α CSP y a HBsAg, siendo la respuesta a HBsAg significativamente más fuerte que la respuesta a P α CSP (Tabla 4).

En voluntarios sensibilizados con ADN que también fueron positivos para anticuerpos HbsAg, el número de ensayos positivos después de la primera dosis de RTS,S fue mayor para HBsAg que lo que fue para P α CSP (12/15 frente a 4/15, $p = 0,0034$) (Tabla 3). Tras administrar la segunda dosis de vacuna de RTS,S, sin embargo, la frecuencia de ensayos positivos para P α CSP no fue diferente de la frecuencia para HBsAg en voluntarios positivos para anticuerpos HBsAg. Véanse los datos de frecuencia para voluntarios sensibilizados con ADN. En voluntarios negativos para anticuerpos para HbsAg sensibilizados con ADN, estas frecuencias no fueron diferentes después de la primera dosis o segunda dosis de la vacuna de RTS,S. La magnitud de respuestas a P α CSP y HbsAg fue similar después de la primera dosis independientemente del estado de anticuerpos para HbsAg (Tabla 3). Pero después de la segunda dosis en individuos positivos para anticuerpos para HBsAg sensibilizados con ADN, la magnitud de respuestas a HBsAg aumentó significativamente en comparación con la magnitud de respuestas a P α CSP (intervalo de CFM/10⁶ CMSP [media geométrica]: 18,1-68,8 [33,8] frente a 18,8-131,3 [52,8], $p = 0,024$). Estos resultados indicaron que las respuestas a HBsAg pueden predominar con el tiempo con respecto a las respuestas a P α CSP si se administran múltiples dosis de la vacuna de RTS,S.

Ejemplo 5

La vacuna de ADN induce tanto respuestas tipo Tc1 (CD8⁺) como Th1 (CD4⁺) mientras que RTS,S induce solo respuestas Th1 en seres humanos

Tanto la vacuna de ADN de P α CSP como la vacuna de RTS,S sola es capaz de inducir respuestas de IFN- γ , de manera que después de la segunda dosis de vacuna de RTS,S, las respuestas de IFN- γ en ambos grupos fueron equivalentes en términos de los respondedores positivos (8/10 en comparación con 11/14) (Tabla 1). Sin embargo, como se ha informado previamente, las respuestas de IFN- γ inducidas por la vacuna de ADN de P α CSP o vacuna de RTS,S sola dependieron de diferentes subconjuntos de linfocitos T. La inmunización con ADN induce tanto respuestas de IFN- γ dependientes de linfocito T CD4⁺ como CD8⁺ (107), y RTS,S induce solo respuestas dependientes de linfocitos CD4⁺ (61).

Los perfiles de linfocitos T de respuestas de IFN- γ en tanto las fases de inducción como efectora *in vitro* se caracterizaron por ELISPOT y PCR en tiempo real, respectivamente, con CMSP de los voluntarios inmunizados con ADN solo, RTS,S solo, o de los voluntarios sensibilizados con ADN/reforzados con RTS,S.

Los ensayos de ELISPOT se llevaron a cabo con CMSP agotadas en linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ antes del cultivo con péptidos usando Dynabeads M-450 recubiertas con anti-CD4⁺ o anti-CD8⁺ (Dyna, Inc., Great Neck, NY). Se midieron los niveles de expresión de ARNm de IFN- γ por PCR en tiempo real en poblaciones de linfocitos T selectivamente enriquecidas: linfocitos T CD4⁺/CD45RA⁺, CD4⁺/CD45RA⁻, CD8⁺/CD45RA⁺ y CD8⁺/CD45RA⁻. En

estos ensayos, se recuperaron CMSP congeladas por cultivo durante la noche en placa de 24 pocillos a 3×10^6 células/pocillo en 2 ml de medio RPMI completo con 10 % de suero AB humano, y entonces se estimularon con péptido corto (secuencia de péptidos A2 de 9-10 aminoácidos GILGFVFTL; SEQ. ID. NO. 27) durante 2 horas, o péptidos largos (15-20 aminoácidos) durante 4 h a 10 $\mu\text{g/ml}$. Entonces, las CMSP se recogieron y se enriquecieron en linfocitos T CD8^+ o CD4^+ usando el kit MACS MultiSort, y entonces las células CD45RA^+ y CD45RA^- se separaron pasando los linfocitos T CD4^+ o CD8^+ enriquecidos a través de MicroBeads CD45RA (Miltenyi Biotec, Auburn, CA).

Para cuantificar el ARNm de IFN- γ por PCR en tiempo real, se aisló ARN total de subconjuntos de linfocitos T enriquecidos usando el kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). El ADNc se sintetizó a partir del ARN total usando hexámeros al azar y el kit de transcripción inversa TaqMan (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Se hizo una cuantificación relativa de ARNm de IFN- γ por PCR en tiempo real en un detector de secuencias ABI PRISM 7700 (Perkin-Elmer) usando el kit de PCR TaqMan según instrucciones del fabricante. Los cebadores, sondas y patrones para amplificar el ARNm de IFN- γ y de GAPDH se diseñaron y se normalizaron internamente. Se hizo una cuantificación relativa del ARNm de IFN- γ por PCR en tiempo real en un detector de secuencias ABI PRISM 7700 (Perkin-Elmer) usando el kit de PCR TaqMan según instrucciones del fabricante. Los cebadores (hIFN-g-F, TTGGTGATGATTTGAACATTGGA, SEQ. ID. NO. 28; hIFN-g-R, CCCAGTTCCTGCAGAGTAGAAAA, SEQ. ID. NO. 29; hGAPDH-F, 5'GAA GGTGAAGGTCGGAGTC, SEQ. ID. NO. 30; hGAPDH-R, GAAGATGGTGATGGGATTTC SEQ. ID. NO. 31), sondas (sonda de hIFN-g: TGTCATTG CAAACACACAGCTTGTCGAA, SEQ. ID. NO. 32; sonda de hGAPDH: CAAGCTTCCCCTTCAGCC, SEQ. ID. NO. 33) para amplificar el ARNm de IFN- γ y de GAPDH se diseñaron y se normalizaron internamente siguiendo el protocolo del fabricante. La amplificación de GAPDH se hizo para cada muestra experimental como un control endógeno para explicar diferencias en la cantidad y la calidad del ARN total añadido a cada reacción. Las condiciones de los ciclos térmicos fueron 2 min a 50 °C y 10 min a 95 °C, seguido de 50 ciclos de PCR de 2 etapas que consiste en 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. Todas las muestras se amplificaron por triplicado. El ciclo umbral (Ct), que se correlaciona inversamente con los niveles de ARNm diana, se midió como el número de ciclos al que la emisión fluorescente del indicador aumentó por encima de un nivel umbral. La expresión del gen diana se normalizó entre diferentes muestras basándose en los valores de expresión del gen GAPDH.

Poblaciones de linfocitos T agotadas se incubaron con péptidos de PfCSP definidos antes de los ensayos de ELISPOT con el fin de identificar qué subconjuntos de linfocitos T participaban en la fase de inducción de respuestas de IFN- γ *in vitro*. En paralelo, se evaluaron los niveles de expresión de ARNm de IFN- γ por PCR en tiempo real en subconjuntos enriquecidos de poblaciones de linfocitos T después de la incubación de CMSP con los mismos péptidos usados para los ensayos de ELISPOT para definir los linfocitos T efectores que en realidad secretaron IFN- γ . Se evaluaron las respuestas al péptido DR.363 (que contiene solo un epítipo de linfocito T CD4^+ limitado a la clase II) y DR.316 (que contiene epítopos de CD4^+ y CD8^+ limitados a la clase I y la clase II que se solapan) para comparar los mecanismos subyacentes a las respuestas de IFN- γ contra PfCSP por diferentes sistemas de administración de vacunas. También se evaluaron las respuestas al epítipo de linfocito T CD8^+ limitado a HLA-A2, inmunodominante y conservado de la proteína de la matriz de la gripe (M A2 de la gripe) y el epítipo de linfocito T CD4^+ limitado a HLA-DR de la toxina del tétanos (TT-DR) en paralelo para proporcionar la normalización interna entre diferentes epítopos, ensayos y voluntarios.

La inducción *in vitro* de respuestas de IFN- γ al péptido M A2 de la gripe fue dependientes de linfocitos CD8^+ , pero no CD4^+ , ya que el agotamiento de linfocitos T CD8^+ , pero no CD4^+ , inmediatamente antes del cultivo de CMSP anuló completamente o redujo significativamente las respuestas de IFN- γ en los 17 individuos probados, independientemente de qué tipo de vacuna contra la malaria recibieron (Fig. 2a). A diferencia, las respuestas al péptido TT-DR fueron completamente dependientes de linfocitos T CD4^+ , no CD8^+ , en los 3 respondedores positivos probados (Fig. 2b).

Los niveles de expresión de ARNm de IFN- γ medidos por PCR en tiempo real en 4 poblaciones de linfocitos T enriquecidos ($\text{CD4}^+/\text{CD45RA}^+$, $\text{CD4}^+/\text{CD45RA}^-$, $\text{CD8}^+/\text{CD45RA}^+$ y $\text{CD8}^+/\text{CD45RA}^-$) estuvieron de acuerdo con los hallazgos obtenidos de los ensayos de ELISPOT. El ARNm de IFN- γ se reguló por incremento predominantemente en linfocitos T CD8^+ después de la estimulación con el péptido M A2 de la gripe (Fig. 2e: patrones). Los niveles de expresión de ARNm de IFN- γ aumentaron 6,8 veces (intervalo, 3,4-12,9 veces) en linfocitos T CD8^+ en comparación con 2,2 veces (intervalo, 0,98-7,58 veces) en linfocitos T CD4^+ ($p = 0,03$). El porcentaje de regulación por incremento de ARNm de IFN- γ en linfocitos T CD8^+ con respecto a CD4^+ fue del 78 % en promedio (intervalo, 62-99 %). A diferencia, el ARNm de IFN- γ se reguló por incremento predominantemente en linfocitos T CD4^+ después de la estimulación con TT-DR (Fig. 2e: patrones). Los niveles de ARNm de IFN- γ aumentaron 7,6 veces (intervalo, 2,4-18,3) en linfocitos T CD4^+ en comparación con 2,2 veces (intervalo, 1,1-4,6) en linfocitos T CD8^+ ($p = 0,02$). La regulación por incremento de ARNm de IFN- γ en linfocitos T CD4^+ con respecto a linfocitos T CD8^+ fue del 79 % (intervalo, 74-100 %). Estos resultados indicaron que los linfocitos T CD8^+ son efectores funcionales de respuestas de IFN- γ contra el péptido M A2 de la gripe mientras que los linfocitos T CD4^+ son los efectores contra el péptido TT-DR.

Realizando los ensayos en paralelo con dos patrones como se ha descrito anteriormente, los presentes inventores aclararon los perfiles de linfocitos T de respuestas de IFN- γ inducidas por la vacuna de ADN de PfCSP o la vacuna de RTS,S a diferentes péptidos de PfCSP (DR.363 y DR.316). De acuerdo con el hecho de que el péptido DR.363 contiene un epítipo de linfocito T CD4^+ , pero no un epítipo de linfocito T CD8^+ , los resultados de ELISPOT con

poblaciones de linfocitos T agotados mostraron que las respuestas de IFN- γ al péptido DR.363 fueron completamente dependientes de linfocitos CD4⁺ en voluntarios que recibieron la vacuna de ADN de P α CSP sola (2/2 probados, V1 y V5) o RTS,S solo (6/6 probados) (Fig. 2c). Los niveles de expresión de ARNm de IFN- γ en poblaciones de linfocitos T enriquecidos se correlacionaron con la dependencia de linfocitos T por ELISPOT. El ARNm de IFN- γ se reguló por incremento predominantemente en linfocitos T CD4⁺ en tanto voluntarios inmunizados con vacuna de ADN de P α CSP como de RTS,S (Fig. 2e: DR.363). En cinco voluntarios inmunizados con ADN probados, los niveles de ARNm de IFN- γ aumentaron 5,3 veces (intervalo, 2,6-11,5) en linfocitos T CD4⁺ en comparación con 1,7 veces (intervalo, 0,99-3,2) en linfocitos T CD8⁺ ($p = 0,014$). La regulación por incremento de ARNm de IFN- γ en linfocitos T CD4⁺ con respecto a CD8⁺ fue del 74 % (intervalo, 64-91 %). Se observó el mismo patrón en cuatro voluntarios inmunizados con RTS,S probados (Fig. 2e), los niveles de ARNm de IFN- γ aumentaron 9,2 veces (intervalo, 2,9-53,5) en linfocitos T CD4⁺ en comparación con 0,9 veces (intervalo, 0,6-1,1) en CD8⁺, y que la regulación por incremento de ARNm de IFN- γ en linfocitos T CD4⁺ con respecto a CD8⁺ fue del 86 % (intervalo, 73-98 %). Estos resultados proporcionaron la primera evidencia de que la vacuna de ADN de P α CSP indujo respuestas de IFN- γ específicas de P α CSP y dependientes de linfocitos T CD4⁺, además de dependientes de linfocito T CD8⁺, en seres humanos.

Las respuestas de IFN- γ a DR.316 (epítipo de linfocito T CD4⁺ y CD8⁺ que se solapa) dependieron de diferentes subconjuntos de linfocitos T en voluntarios que recibieron tanto la vacuna de ADN de P α CSP como la vacuna de RTS,S sola. Las respuestas fueron tanto dependientes de linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺ en voluntarios que recibieron ADN solo (V1) (Fig. 2d) como se informó previamente (107), en comparación con solo dependientes de linfocito T CD4⁺, pero no CD8⁺, en voluntarios que recibieron la vacuna de RTS,S sola (3/3 voluntarios probados) (Fig. 2d). Además, el ARNm de IFN- γ se reguló por incremento predominantemente en linfocitos T CD8⁺ en voluntarios inmunizados con ADN (Fig. 2e: DR.316), aunque la respuesta fue tanto dependiente de linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺ por ELISPOT.

Los niveles de expresión de ARNm de IFN- γ aumentaron 64,7 veces en linfocitos T CD8⁺ en comparación con 0,36 veces en linfocitos T CD4⁺, y la regulación por incremento del ARNm de IFN- γ en linfocitos T CD8⁺ con respecto a CD4⁺ fue del 99,6 %. A diferencia, la transcripción de ARNm de IFN- γ se reguló por incremento predominantemente en linfocitos T CD4⁺ en voluntarios inmunizados con la vacuna de RTS,S (Fig. 2e: DR.316). Los niveles de expresión de ARNm de IFN- γ aumentaron 24,7 veces (intervalo, 5,3-176,7 veces) en linfocitos T CD4⁺ en comparación con 2,5 veces (intervalo, 1,1-5,6 veces) en linfocitos T CD8⁺. La regulación por incremento del ARNm de IFN- γ en linfocitos T CD4⁺ con respecto a CD8⁺ fue del 86 % (intervalo, 69-98 %). Estos hallazgos indicaron que, con la inmunización con ADN, los linfocitos T CD4⁺ participaron en la fase de inducción *in vitro* de respuestas de IFN- γ y que los linfocitos T CD8⁺ son las células que en realidad secretan IFN- γ contra DR.316. A diferencia, en los individuos inmunizados con la vacuna de RTS,S, estos resultados indican que los linfocitos T CD4⁺ son los linfocitos T efectores que producen IFN- γ contra el mismo péptido (DR.316).

Ejemplo 6

La sensibilización con ADN/refuerzo con RTS,S amplía el repertorio de linfocitos T productores de IFN- γ

Se definió el repertorio de linfocitos T productores de IFN- γ traídos a la memoria reforzando con la vacuna de RTS,S en voluntarios sensibilizados con ADN. Las respuestas de IFN- γ al péptido DR.363 (no contiene un epítipo de linfocito T CD8⁺) fueron solo dependientes de linfocitos CD4⁺ en voluntarios inmunizados con tanto la vacuna de ADN de P α CSP como la vacuna de RTS,S sola. El mismo tipo de respuesta a DR.363 se detectó en 2/3 respondedores (V1 y V5) en el grupo sensibilizado con ADN después del refuerzo con RTS,S. Sorprendentemente, la magnitud de las respuestas medidas por niveles de expresión de ARNm de IFN- γ en linfocitos T CD4⁺ aumentó 94,9 veces en el voluntario V1 y 46,7 veces en V5 después del refuerzo con RTS,S en comparación con un aumento de 7,6 veces en V1 y 12,5 veces en V5 después de la inmunización con 3 dosis de ADN solo. Véanse las barras de "ADN solo" en la Figura 3. La magnitud de las respuestas después del refuerzo con RTS,S fue 12,5 veces mayor en V1 y 3,7 veces mayor en V5 que aquella después de la inmunización con ADN (Fig. 3; compárense las barras de "ADN solo" con las barras de "ADN/RTS,S").

Las respuestas de IFN- γ al péptido DR.316 dependieron de diferentes subconjuntos de linfocitos T en voluntarios que recibieron tanto la vacuna de ADN de P α CSP como la vacuna de RTS,S sola. Las respuestas inducidas por ADN fueron tanto dependientes de linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺ en la fase de inducción, pero solo dependientes de linfocitos T CD8⁺ en la fase efectora. Cuando se mide la fase efectora, las poblaciones de linfocitos T se agotaron después de la estimulación con péptidos. A diferencia, las respuestas inducidas por RTS,S fueron solo dependientes de linfocitos CD4⁺ en tanto las fases de inducción como efectora. Así, no fue sorprendente que las respuestas a DR.316 en voluntarios sensibilizados con ADN después del refuerzo con RTS,S fueran una mezcla de los dos patrones observados en voluntarios inmunizados con tanto ADN como RTS,S solo (Fig. 2d).

En la fase de inducción *in vitro*, tanto las respuestas de IFN- γ dependientes de linfocitos CD4⁺ como CD8⁺ a DR.316 se detectaron en 3/5 respondedores (4/6 ensayos) después de la primera dosis de RTS,S. Se detectaron respuestas de IFN- γ completamente dependientes de linfocitos CD4⁺, pero solo parcialmente dependientes de linfocitos T CD8⁺, en 4/6 respondedores (7/12 ensayos) después de la segunda dosis de RTS,S. El agotamiento de linfocitos T CD8⁺ no anuló la producción de IFN- γ (Fig. 4a), que indica que los linfocitos T CD4⁺ producen IFN- γ , además de linfocitos

T Cod8+, después del refuerzo con RTS,S. Simultáneamente, en la fase efectora, los niveles de expresión de ARNm de IFN- γ se regularon por incremento no solo en linfocitos T CD8⁺ (8/8 respondedores), sino también en linfocitos T CD4⁺ (4/8 respondedores después de la primera dosis, 6/8 respondedores después de la segunda dosis de RTS,S), en comparación con ser regulada por incremento en solo linfocitos T CD8⁺ en voluntarios inmunizados con ADN solo, o en solo linfocitos T CD4⁺ en voluntarios inmunizados con RTS,S solo (Fig. 2e: DR.316 compárese V1 (ADN) con V22 (RTS,S)).

En general, la regulación por incremento de ARNm de IFN- γ en tanto linfocitos T CD8⁺ como CD4⁺ se detectó en 6 de los 8 respondedores, y la regulación por incremento de ARNm de IFN- γ en linfocitos T CD4⁺ osciló de 3,0 a 28,3 veces (media geométrica, 6,6 veces) en comparación con aquella en linfocitos T CD8⁺, que osciló de 4,0 a 281,03 (media geométrica, 19,7 veces) después de los refuerzos con RTS,S. El porcentaje de regulación por incremento de ARNm de IFN- γ en linfocitos T CD4⁺ con respecto a CD8⁺ fue del 23,5 % (intervalo, 6,5-45,1 %). Los resultados aquí demostraron que los linfocitos T CD4⁺ específicos de DR.316 en voluntarios sensibilizados con ADN después del refuerzo con RTS,S funcionaron no solo como linfocitos T colaboradores para la producción por linfocitos T CD8⁺ de IFN- γ (una característica de la respuesta de IFN- γ inducida por ADN), sino también como efectores que producen IFN- γ (una característica de la respuesta de IFN- γ inducida por RTS,S) (Tabla 5).

Los datos anteriores demuestran las respuestas de IFN- γ dependientes de linfocitos T CD8⁺ en voluntarios sensibilizados con ADN-reforzados con RTS, pero no en los voluntarios no sensibilizados. Estos datos también demuestran tanto las respuestas de IFN- γ dependientes de CD4 como CD8 a los mismos epítopes. Se identificó que el péptido DR.316 era un epítipo de solapamiento de CD4 y CD8, basándose en la dependencia de respuestas de IFN- γ sobre diferentes subconjuntos de linfocitos T.

Tabla 4 Comparación de las respuestas de IFN- γ en grupos sensibilizados con ADN y no sensibilizados después de la inmunización con RTS,S

Respuestas de IFN- γ a	Antígeno específico PfCSP		Antígeno de esqueleto HBsAg	
Serología de HBsAg en el nivel inicial	HBsAg (+)	HBsAg (-)	HBsAg (+)	HBsAg (-)
Grupo sensibilizado con ADN				
Después de la primera dosis	++	++	++	++
Después de la de segunda dosis	++	++	++	++
Grupo no sensibilizado				
Después de la primera dosis	+/-	-	+++	+++
Después de la segunda dosis	+	++	++++	++++

Los criterios para la puntuación de sensibilidad se basan en el aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en términos de (1) la frecuencia de respondedores positivos, (2) la frecuencia de ensayos positivos, y (3) la magnitud de respuestas positivas en comparación con el nivel inicial, además de (4) un aumento significativo en las respuestas de IFN- γ después de la segunda inmunización en comparación con después de la primera inmunización. -, sin respuesta; +/-, un aumento pero no estadísticamente significativo; +, ++, +++ y ++++ representan el aumento significativo en uno, 2, 3 o 4 de los 4 criterios, respectivamente.

Ejemplo 7

Respuestas de anticuerpos en voluntarios sensibilizados con ADN/reforzados con RTS,S

Se evaluaron las respuestas de anticuerpos contra esporozoítos de *P. falciparum* secados al aire antes de la inmunización con RTS,S, y a las 2, 4, 6 y 8 semanas después de la primera dosis y 1, 2, 4 y 6 semanas después de la segunda dosis de RTS,S. Se determinaron los títulos de anticuerpos por la prueba de anticuerpos fluorescentes indirecta (IFAT) como se describió previamente (33). Como era de esperar, los títulos de anticuerpos fueron excelentes, aunque hubo alguna variabilidad en las respuestas de anticuerpos entre los grupos (Fig. 5). Los títulos alcanzaron el punto máximo 4 semanas después de la segunda dosis de RTS,S con títulos medios geométricos que oscilaban de 5120 a 20480. Sin embargo, no hubo diferencia estadísticamente significativa en los títulos de anticuerpos contra esporozoítos completos en ningún momento de tiempo con una excepción. A las 2 semanas después de la primera dosis, el título medio geométrico de los anticuerpos por IFAT, 3225, en el grupo de voluntarios que nunca habían recibido PfCSP y tuvo anticuerpos para HBsAg (ADN-/HB+) fue superior al título medio geométrico, 718,4, en los voluntarios que habían recibido PfCSP y tuvieron anticuerpos para HBsAg (ADN+/HB+) ($P = 0,02$). Esto fue principalmente debido al alto título, 10240, de un único voluntario en el grupo de ADN-/HB+ que se sacó del estudio después del momento de tiempo de 6 semanas, justo antes de la segunda inmunización planeada con RTS,S. La diferencia estadísticamente significativa entre los grupos no estuvo presente tras la segunda dosis de

RTS,S.

CONCLUSIONES

El proceso de desarrollar una vacuna sostenible eficaz contra infecciones como *P. falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis* y el VIH ha demostrado ser más lento, más difícil y completo de lo esperado. El análisis anterior de la invención demuestra que la sensibilización con el ADN de *PfCSP* y el refuerzo con RTS,S conduce a la inducción de respuestas por tanto los brazos celular como humoral del sistema inmunitario. Además, entre los individuos con anticuerpos para HBsAg, aquellos individuos sensibilizados con la vacuna de ADN de *PfCSP* produjeron respuestas de linfocitos T significativamente mejores después de la administración de la vacuna adyuvantada con RTS,S que los voluntarios que nunca recibieron ADN de *PfCSP*. Como la mayoría de los receptores de las vacunas contra la malaria, u otras vacunas, tendrán anticuerpos para HBsAg, tanto debido a inmunización como a infección, esto puede proporcionar una ventaja importante de esta estrategia de inmunización por sensibilización-refuerzo.

Este análisis muestra que las respuestas de CTL específicas de *PfCSP* sensibilizadas con ADN fueron traídas a la memoria en el 50 % de los voluntarios reforzando con RTS,S 12-14 meses después de la última vacunación con ADN, que indica que la vacuna de ADN fue altamente eficaz en la inducción de respuestas de linfocitos T de memoria de larga duración. Dos de los 5 voluntarios con respuestas de CTL traídas a la memoria después de la inyección de RTS,S no tuvieron CTL detectables después de la inmunización con ADN solo, sugiriendo que la inmunización con la vacuna de ADN fue superior para la inducción de CTL de memoria en estos individuos, pero puede no haber sido óptima para la inducción de respuestas de linfocitos T efectores (38, 92). Como no hubo respuestas de CTL detectadas en voluntarios no sensibilizados que recibieron RTS,S solo, RTS,S no fue capaz de sensibilizar CTL específicos de *PfCSP*, pero tuvo la capacidad de reforzar las respuestas de CTL iniciadas por la vacuna de ADN. Las respuestas de IFN- γ específicas de *PfCSP* sensibilizadas con ADN también se reforzaron fuertemente por RTS,S, particularmente después de la primera dosis. Seis de los 10 voluntarios sensibilizados con ADN tuvieron respuestas de IFN- γ contra los 4 péptidos probados en comparación con 2 de los 14 voluntarios no sensibilizados, que tuvieron respuestas contra solo uno de los 4 péptidos. Después de dos dosis de RTS,S, aunque no hubo diferencia significativa en términos de la frecuencia y la magnitud de las respuestas, la anchura de las respuestas de IFN- γ al nivel de epítipo fue significativamente mayor en voluntarios sensibilizados con ADN que en no sensibilizados. Siete de los 8 voluntarios sensibilizados con ADN frente a 3/11 no sensibilizados respondieron a al menos 2 péptidos probados ($p = 0,0094$).

Los resultados también sugieren que la sensibilización con ADN/refuerzo con RTS,S amplía el repertorio de linfocitos T productores de IFN- γ . La sensibilización con ADN inició dos perfiles de linfocitos T productores de IFN- γ : (1) respuestas de tipo 1 CD8⁺ dependientes de linfocitos CD4⁺ contra epítopes de linfocitos T CD4⁺/CD8⁺ que se solapan (DR.316 y DR.318), y (2) respuestas de IFN- γ de tipo 1 CD4⁺ contra epítopes de linfocitos T CD4⁺ limitados a DR (DR.363). RTS,S solo, por otra parte, solo indujo respuestas de IFN- γ de tipo 1 CD4⁺ (Fig. 2). Con respecto a DR.316, un epítipo de linfocitos T CD4⁺/CD8⁺ que se solapan, el ADN solo indujo respuestas de tipo 1 CD8⁺ dependientes de CD4⁺ y RTS,S solo indujo respuestas de tipo 1 CD4⁺ contra este péptido. Sin embargo, la sensibilización con ADN y el refuerzo con RTS,S indujo ambos patrones de respuestas de IFN- γ a DR.316 simultáneamente (Fig. 4, Tabla 4). Además, las respuestas de CTL estimuladas por RTS,S a nuevos epítopes de CTL no se detectaron después de la sensibilización con ADN.

Los linfocitos T CD4⁺ pueden funcionar en una capacidad colaboradora de espectador para la producción por linfocito T CD8⁺ de IFN- γ . Los resultados anteriores confirman esta hipótesis realizando ensayos de ELISPOT y PCR en tiempo real en paralelo, en poblaciones de linfocitos T agotadas y enriquecidas antes y después de la estimulación de CMSP con péptido *in vitro*, respectivamente. La comparación de los números de células productoras de IFN- γ y los niveles de expresión de ARNm de IFN- γ antes o después de la estimulación del péptido definen los perfiles funcionales de linfocitos T que participan en las respuestas de IFN- γ inducidas por tanto la vacuna de ADN como la vacuna de RTS,S sola.

Los resultados aquí sugieren que la sensibilización con ADN puede dirigir después del refuerzo respuestas al antígeno sensibilizado. Con respecto a la inmunización con RTS,S, esto parece ser de particular importancia. RTS,S se diseñó con HBsAg como vehículo que potenciaría las respuestas de linfocitos T al antígeno de la malaria *PfCSP*. Los individuos con anticuerpos contra anticuerpos para HBsAg en el nivel inicial se habían inmunizado previamente con la vacuna de la hepatitis B. Cabría esperar que una vacuna contra la malaria que se administró en el África subsahariana tuviera una población diana con exposición natural significativa o vacunación previa a HBsAg.

La comparación de las respuestas de IFN- γ a *PfCSP* entre los voluntarios sensibilizados con ADN y no sensibilizados mostró diferencias significativas entre aquellos individuos que tenían anticuerpos anti-HBsAg existentes (Tabla 1, 3 y 5). La comparación en paralelo de las respuestas de IFN- γ a HBsAg y *PfCSP* revelaron individualmente que las respuestas de IFN- γ inducidas por RTS,S fueron significativamente más bajas a *PfCSP* que a HbsAg en todos los voluntarios que no se sensibilizaron con ADN, y fueron incluso más bajas en individuos con anti-HBsAg pre-existente. Aunque 13/14 voluntarios de control respondieron a HBsAg después de una dosis de RTS,S, las respuestas de IFN- γ a *PfCSP* solo fueron detectadas en uno de los 14 individuos. Por otra parte, las respuestas al antígeno del esqueleto en voluntarios sensibilizados con ADN tuvieron poco o ningún impacto sobre la inducción de respuestas de IFN- γ a *PfCSP*, ya que tanto la frecuencia como la magnitud de las respuestas de IFN- γ

a *PfCSP* fueron equivalentes entre individuos seropositivos y seronegativos para HBsAg después del refuerzo con RTS,S (Tabla 5). Estos resultados demostraron que el ADN inicia y dirige las respuestas de linfocitos T hacia el antígeno específico, y equilibra la inmunidad deseada junto con las respuestas de fondo. Los voluntarios sensibilizados con ADN tienen respuestas de IFN- γ comparables a tanto *PfCSP* como a HBsAg independientemente de la seropositividad para anti-HBsAg; los voluntarios no sensibilizados tienen respuestas de IFN- γ significativamente más fuertes a HBsAg en comparación con *PfCSP* (Tabla 4).

Ahora hay un esfuerzo considerable dirigido a producir proteínas de fusión recombinantes y virus recombinantes y bacterias que expresan la(s) proteína(s) diana. En muchos casos, para HBsAg, variolovacuna, virus de la polio y *Salmonella typhi*, los individuos inmunizados tendrán anticuerpos pre-existentes contra estos componentes de esqueleto de la vacuna. El hecho de que en individuos con anticuerpos para el componente de esqueleto de la vacuna (por ejemplo, HBsAg), la sensibilización con ADN que codifica proteínas diana potenciara significativamente las respuestas inmunitarias de linfocitos T a estas proteínas en comparación con la sensibilización con proteína recombinante sola puede ser una ventaja de esta estrategia de inmunización por sensibilización-refuerzo.

Tabla 5 Repertorio de linfocitos T de respuestas de IFN- γ específicas de antígeno

Péptido	ADN solo	RTS,S solo	Sensibilización con ADN/refuerzo con RTS,S
M A2 de la gripe (epítotope T CD8⁺)			
Fase de inducción	CD8 ⁺	CD8 ⁺	CD8 ⁺
Fase efectora	CD8 ⁺	CD8 ⁺	CD8 ⁺
TT-DR (epítotope T CD4⁺)			
Fase de inducción	CD4 ⁺	CD4 ⁺	CD4 ⁺
Fase efectora	CD4 ⁺	CD4 ⁺	CD4 ⁺
<i>PfCSP</i> DR.363 (epítotope T CD4⁺)			
Fase de inducción	CD4 ⁺	CD4 ⁺	CD4 ⁺
Fase efectora	CD4 ⁺	CD4 ⁺	CD4 ⁺
<i>PfCSP</i> DR.316 (epítotope T CD4⁺ y CD8⁺ que se solapan)			
Fase de inducción	CD4 ⁺ y CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD4 ⁺ y CD8 ⁺
Fase efectora	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺ y CD4 ⁺

La sensibilización de respuestas inmunitarias usando ADN como vehículo de vacuna permite centrar las respuestas de linfocitos T iniciales en el inmunogén recombinante, simplemente debido a que es la única proteína extraña expresada en una vacuna de ADN. Aunque RTS,S recombinante o los poxvirus pueden ser intrínsecamente más inmunogénicos que los vectores de ADN como vehículos de vacuna, las células infectadas con virus producen un gran número de epítotoes derivados de virus que compiten con el inmunogén recombinante por la inmunodominancia de linfocitos T. Muchos individuos que reciben una vacuna habrán estado lo más probablemente expuestos naturalmente a los antígenos del vehículo, o han recibido otras vacunaciones que contienen el antígeno en un virus recombinante o proteína, de manera que las respuestas efectoras contra los antígenos del vehículo interferirán con la inducción de respuestas de linfocitos T a antígenos específicos.

En este estudio, las respuestas de CTL y IFN- γ dependientes de linfocito T CD8⁺, colaboradores CD4⁺ específicas de antígeno, y respuestas de IFN- γ dependientes de linfocitos CD4⁺ de tipo Th1 se lograron todas simultáneamente en voluntarios humanos por una estrategia de inmunización por sensibilización con ADN/refuerzo con proteína recombinante. Esta estrategia, capaz de inducir ambos brazos de la respuesta inmunitaria, ofrece ventajas únicas para vacunas preventivas y terapéuticas.

Las siguientes publicaciones, además de aquellas mencionadas en cualquier parte en la presente solicitud, se incorporan por este documento específicamente por referencia:

1. Aguiar JC, Hedstrom RC, Rogers WO, Charoenvit Y, Sacchi JB Jr, Lanar DE, Majam VF, Stout RR, and Hoffman SL. Enhancement of the immune response in rabbits to a malaria DNA vaccine by immunization with a needle-free jet device. *Vaccine* 20:275-80 (2001).
2. Aidoo, M., Lalvani, A., Allsopp, C.E., Plebanski, M., Meisner, S.J., Krausa, P., Browning, M., Morris Jones, S., Gotch, F., Fidock, D.A. and et al, Identification of conserved antigenic components for a cytotoxic T lymphocyte-

inducing vaccine against malaria. *Lancet* 345:1003 (1995).

3. al Yaman, F., Genton, B., Anders, R., Falk M, Triglia T, Lewis, D. et al. Relationship between humoral response to *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 and malaria morbidity in a highly endemic area of Papua New Guinea. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 51:593 (1994).

4. al Yaman, F., Genton, B., Anders R, Taraika J, Ginny M, Mellor S et al. Assessment of the role of the humoral response to *Plasmodium falciparum* MSP2 compared to RESA and SPf66 in protecting Papua New Guinean children from clinical malaria. *Parasite Immunol* 17:493 (1995).

5. Anders RF, Crewther PE, Edwards S, Margetts M, Matthew ML, Pollock B, Pye D. Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. *Vaccine* 16(2-3):240-7 (1998).

6. Barouch, D.H., et al. Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science* 290, 486-92. (2000).

7. Blackman, M.J., Heidrich, H.G., Donachie, S., McBride, J.S. and Holder, A.A. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J.Exp.Med.* 172:379 (1990).

8. Bojang KA, Milligan PJ, Pinder M, Vigneron L, Allouche A, Kester KE, Ballou WR, Conway DJ, Reece WH, Gothard P, Yamuah L, Delchambre M, Voss G, Greenwood BM, Hill A, McAdam KP, Tornieporth N, Cohen JD, Doherty T; RTS, S Malaria Vaccine Trial Team. Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial. *Lancet* 358:1927-34 (2001).

9. Brazolot Millan CL, Weeratna R, Krieg AM, Siegrist CA, Davis HL. CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:15553-8 (1998).

10. Bums, J.M., Daly, T.M., Vaidya, A.B. and Long, C.A. The 3'portion of the gene for a *Plasmodium yoelii* merozoite surface antigen encodes the epitope recognized by a protective monoclonal antibody. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 5:602 (1988).

11. Calarota, S. et al. Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients. *Lancet* 351:1320-25 (1998).

12. Chang, S.P., Case, S.E., Gosnell, W.L., Hashimoto, A., Kramer, K.J., Tam, L.Q., Hashiro, C.Q., Nikaido, C.M., Gibson, H.L., Lee Ng, C.T., Barr, P.J., Yokota, B.T. and Hut, G.S. A recombinant baculovirus 42-kilodalton C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 protects Aotus monkeys against malaria. *Infect.Immun.* 64:253 (1996).

13. Charoenvit, Y., Leef, M.L., Yuan, L.F., Sedegah, M. and Beaudoin, R.L. Characterization of *Plasmodium yoelii* monoclonal antibodies directed against stage-specific sporozoite antigens. *Infect.Immun.* 55:604 (1987).

14. Charoenvit, Y., Collins, W.E., Jones, T.R., Millet, P., Yuan, L., Campbell, G.H., Beaudoin, R.L., Brodersen, J.R. and Hoffman, S.L. Inability of malaria vaccine to induce antibodies to a protective epitope within its sequence. *Science* 251:668 (1991).

15. Charoenvit, Y., Mellouk, S., Cole, C., Bechara R., et al. *Plasmodium yoelii*: 17-kD hepatic and erythrocytic stage protein is the target of an inhibitory monoclonal antibody. *Exp Parasitol.* 80:419-429 (1995).

16. Charoenvit, Y., Fallarme Majam, V., Corradin, G.P., et al. CD4+ T-cell- and gamma interferon dependent protection against murine malaria by immunization with linear synthetic peptide from *Plasmodium yoelii* 17-kilodalton hepatocyte erythrocyte protein. *Infect.Immun.* 67:5604-5614 (1999).

17. Clark, J.T, Donachi S., Anand R. et al. 46-53 kD glycoprotein from the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites, *Mol Biochem.* 32: 15-24 (1988).

18. Collins, W.E., Galland, G.G., Sullivan, J.S. and Morris, C.L. Selection of different strains of *Plasmodium falciparum*. for testing blood-stage vaccines in *Aotus nancymai* monkeys. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 51:224-232 (1994).

19. Collins, W.E., Pye, D., Crewther, P.E., Vandenberg, K.L., Galland, G.G., Sulzer, A.J., Kemp, D.J., Edwards, S.J., Coppel, R.L., Sullivan, J.S., Morris, C.L. and Anders, R.F. Protective immunity induced in squirrel monkeys with recombinant apical membrane antigen-1 of *Plasmodium fragile*. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 57:711-719 (1994).

20. Daly, T.M. and Long, C.A. A recombinant 15-kilodalton carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelii* yoelli 17XL merozoite surface protein 1 induces a protective immune response in mice. *Infect.Immun.* 61:2462-2467 (1993).

21. Dame JB, Williams JL, McCutchan TF, Weber JL, Wirtz RA, Hockmeyer WT, Maloy WL, Haynes JD, Schneider I, Roberts D, et al. Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 225(4662):593-9 (1984).

22. Daubersies P, Thomas AW, Millet P, Brahimi K, Langermans JA, Ollomo B, BenMohamed L, Slierendregt B, Eling W, Van Belkum A, Dubreuil G, Meis JF, Guerin-Marchand C, Cayphas S, Cohen J, Gras-Masse H, Druilhe P, and Mohamed LB. Protection against *Plasmodium falciparum* malaria in chimpanzees by immunization with the conserved pre-erythrocytic liver-stage antigen 3. *Nat Med.* 6:1258-63 (2000).

23. Davis HL, Weeratna R, Waldschmidt TJ, Tygrett L, Schorr J, Krieg AM, Weeranta R. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol.* 160:870-6 (1998).

24. Deans, J.A. Protective antigens of blood stage ; *plasmodium knowlesi* parasites. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.Biol.* 307:159-169 (1984).

25. Deans, J.A., Knight, A.M., Jean, W.C., Waters, A.P., Cohen, S. and Mitchell, G.H. Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, *Plasmodium knowlesi* 66 kD merozoite antigen. *Parasite Immunol*, 10:535-552 (1988).

26. Delplace P, Bhatia A, Cagnard M et al. Protein p126: a parasitophorous vacuole antigen associated with the release of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Biol Cell* 64:215 (1987).
27. Doolan, D.L., Sedegah, M., Hedstrom, R.C., Hobart, P., Charoenvit, Y. and Hoffman, S.L. Circumventing genetic restriction of protection against malaria with multi-gene DNA immunization: CD8+ T cell, interferon-gamma, and nitric oxide dependent immunity. *J. Exp. Med.* 183:1739-1746 (1996).
28. Doolan, D.L., Hedstrom, R.C., Rogers, W.O., Charoenvit, Y., Rogers, M., De la Vega, P. and Hoffman, S.L. Identification and characterization of the protective hepatocyte erythrocyte protein 17 kDa gene of *Plasmodium yoelii*, homolog of *Plasmodium falciparum* exported protein 1. *J. Biol. Chem.* 271:17861-17868 (1996).
29. Doolan, D.L., Hoffman, S.L., Southwood, S., Wentworth, P.A., Sidney, J., Chestnut, R.W., Keogh, E., Apella, E., Nutman, T.B., Lal, A.A., Gordon, D.M., Oloo, A. and Sette, A. Degenerate cytotoxic T cell epitopes from *P. falciparum* restricted by HLA-A and HLA-B supertypes alleles. *Immunity* 7:97-112 (1997).
30. Doolan DL, Hedstrom RC, Gardner MJ, Sedegah M, Wang H, Gramzinski RA, Margalith M, Hobart P, and Hoffman, SL. DNA vaccination as an approach to malaria control: current status and strategies. *Curr Topic Microbiol Immunol* 226:37-56 (1998).
31. Doolan DL, Hoffman SL. IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the *Plasmodium yoelii* model. *J Immunol* 163(2):884-92 (1999).
32. Egan, J.E., Weber, J.L., Ballou, W.R., Hollingdale, M.R., Majarian, W.R., Gordon, D.M., Maloy, W.L., Hoffman, S.L., Wirtz, R.A., Schneider, I., Woollett, G.R., Young, J.F. and Hockmeyer, W.T. Efficacy of murine malaria sporozoite vaccines: implications for human vaccine development. *Science* 236:453-456 (1987).
33. Epstein J, Gorak E, Y Charoenvit, R Wang, N Freyberg, O Osinowo, TL Richie, E Stoltz, F Trespacios, J Nerges, J Ng, V Fallanne-Majam, E Abot, L Goh, S Parker, S Kumar, R Hedstrom, J Norman, R Stout, SL Hoffman. Safety, Tolerability and Lack of Antibody Responses following Administration of a PfCSP DNA Malaria Vaccine via Needle or Needle-free Jet Injection, and Comparison of Intramuscular and Combination Intramuscular/Intradermal Routes. *Human Gene Therapy* 13:1551-60 (2002).
34. Etlinger, H.M., Caspers, P., Matile, H., Schoenfeld, H.J., Stueber, D. and Takacs, B. Ability of recombinant or native proteins to protect monkeys against heterologous challenge with *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.* 59:3498-3503 (1991).
35. Freeman, R.R. and Holder, A.A. Characteristics of the protective response of BALB/c mice immunized with a purified *Plasmodium yoelii* schizont antigen. *Clin. Exp. Immunol.* 54:609-616 (1983).
36. Gordon DM, McGovern TW, Krzych U, Cohen JC, Schneider I, LaChance R, Heppner DG, Yuan G, Hollingdale M, Slaoui M, et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine. *J Infect Dis* 171:1576-85 (1995).
37. Gramzinski RA, Maris DC, Doolan D, Charoenvit, Y, Obaldia N, Rossan R, Sedegah M, Wang R, Hobart P, Margalith M, and Hoffman S. Malaria DNA vaccines in Aotus monkeys. *Vaccine* 15:913-915 (1997).
38. Gurunathan, S., Wu, C.Y., Freidag, B.L. & Seder, R.A. DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Curr Opin Immunol* 12, 442-7 (2000).
39. Harnyuttanakorn P, McBride JS, Donachie S, Heidrich HG, Ridley RG. Inhibitory monoclonal antibodies recognise epitopes adjacent to a proteolytic cleavage site on the RAP-1 protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 55:177-86 (1992).
40. Hedstrom R, Doolan D, Wang R, et al. In vitro expression and in vivo immunogenicity of *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic stage DNA vaccines. *Int J Molec Med* 2:29-38 (1998).
41. Herrington, D., Davis, J., Nardin, E., Beier, M., Cortese, J., Eddy, H., Losonsky, G., Hollingdale, M., Szein, M., Levine, M., Nussenzweig, R.S., Clyde, D. and Edelman, R. Successful immunization of humans with irradiated sporozoites: humoral and cellular responses of the protected individuals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45:539-547 (1991).
42. Hilgers LA, Snippe H, Jansze M, Willers JM. Synergistic effects of synthetic adjuvants on the humoral immune response. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 79:392-6 (1986).
43. Hilgers LA, Snippe H, Jansze M, Willers JM. Synthetic sulpholipopolysaccharides: novel adjuvants for humoral immuneresponses. *Immunology.* 60:141-6 (1987).
44. Hill AVS, Elvin J, Willis AC et al. Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature* 360:434 (1992).
45. Hoffman, S. L. and Doolan, D. L. Malaria vaccines-targeting infected hepatocytes. *Nature Med.* 6:1218-19 (2000).
46. Holder, A.A. and Freeman, R.R. Immunization against blood-stage rodent malaria using purified parasite antigens. *Nature* 294:361-364 (1981).
47. Horn NA, Meek JA, Budahazie G, Marquet M. Cancer Gene Therapy using plasmid DNA: purification of DNA for human clinical trials. *Human Gene Therapy* 6(5): 565-73 (1995).
48. Inselburg, J., Bzik, D.J., Li, W.B., Green, K.M., Kansopon, J., Hahm, B.K., Bathurst, I.C., Barr, P.J. and Rossan, R.N. Protective immunity induced in Aotus monkeys by recombinant SERA proteins of *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.* 59:1247-1250 (1991).
49. Inselburg, J., Bathurst, I.C., Kansopon, J., Barchfeld, G.L., Barr, P.J. and Rossan, R.N. Protective immunity induced in Aotus monkeys by a recombinant SERA protein of *Plasmodium falciparum*: adjuvant effects on induction of protective immunity. *Infect. Immun.* 61:2041-2047 (1993).
50. Kedzierski L, Black CG, and Coppel RL. Immunization with recombinant *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 4/5 protects mice against lethal challenge. *Infect Immun.* 68:6034-7 (2000).
51. Kensil CR, Patel U, Lennick M, Marciani D. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity

from Quillajasaponaria Molina cortex. *J Immunol.* 146:431-7 (1991).

52. Kensil, C.R. Saponins as vaccine adjuvants. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 12:1-55 (1996).

53. Kester K.E., McKinney D.A., Tomieporth N, Ockenhouse C.F., Heppner D.G., Hall T., Krzych U., Delchambre M, Voss G, Dowler MG, Palensky J, Wittes J, Cohen J, Ballou WR; RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group.
5 Efficacy of Recombinant Circumsporozoite Protein Vaccine Regimens Against Experimental Plasmodium falciparum Malaria. *J Infect Dis* 183(4):640-7 (2001).

54. Kester, K. E. et al. Efficacy of recombinant circumsporozoite protein vaccine regimens against experimental Plasmodium falciparum malaria. *J. Infect. Dis.* 183:640-47 (2001).

55. Khusmith, S., Charoenvit, Y., Kumar, S., Sedegah, M., Beaudoin, R.L. and Hoffman, S.L. Protection against
10 malaria by vaccination with sporozoite surface protein 2 plus CS protein. *Science* 252:715-718 (1991).

56. Khusmith, S., Sedegah, M. and Hoffman, S.L. Complete protection against Plasmodium yoelii by adoptive transfer of a CD8+ cytotoxic T cell clone recognizing sporozoite surface protein 2. *Infect.Immun.* 62:2979-2983 (1994).

57. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, KoretzkyGA, Klinman DM. CpG motifs
15 in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature.* 374:546-9 (1995).

58. Kumar, S., Yadava, A., Keister, D.B., Tian, J.H., Ohl, M., Perdue Greenfield, K.A., Miller, L.H. and Kaslow, D.C. Immunogenicity and in vivo efficacy of recombinant Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 in Aotus monkeys. *Mol.Med.* 1:325-332 (1995).

59. Kumar S, Collins W, Egan A, Yadava A, Garraud O, Blackman MJ, Patino JA, Diggs C, Kaslow DC. Immunogenicity and Efficacy in Aotus Monkeys of Four Recombinant Plasmodium falciparum Vaccines in Multiple Adjuvant Formulations Based on the 19-Kilodalton C Terminus of Merozoite Surface Protein 1. *Infect Immun* 68:2215-2223 (2000).

60. Lacaille-Dubois, M and Wagner H. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* 2:363-386 (1996).

61. Lavani A, Moris P, Voss G, Pathan A, et al. Potent induction of focused Th1-Type cellular and humoral immune responses by RTS,S/SBAS2, a recombinant Plasmodium falciparum malaria vaccine. *J Infect Dis* 180:1656-64 (1999).

62. Le T, Coonan K, Hedstrom R, et al. Safety, tolerability, and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers. *Vaccine* 18:1893-1901 (2000).

63. Lee, A. Y. et al. Quantification of the number of cytotoxic T cells specific for an immunodominant HCV-specific CTL epitope primed by DNA immunization. *Vaccine* 18:1962-68 (2000).

64. Luke CJ, Carner K, Liang X, Barbour AG. An ospA-based DNA vaccine protects mice against infection with Borrelia burgdorferi. *J Inf Dis* 175:191-7 (1997).

65. Majarian WR, Daly TM et al. Passive immunization against murine malaria with an IgG3 monoclonal antibody. *J Immunol* 132: 3131 (1984).

66. Malik, A., Egan, J.E., Houghten, R.A., Sadoff, J.C. and Hoffman, S.L. Human cytotoxic T lymphocytes against the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88:3300-3304 (1991).

67. Martin T, Parker SE, Hedstrom R, et al. Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration following intramuscular injection. *Human Gen Ther* 10:759-68 (1999).

68. McCluskie MJ, Davis HL. CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice. *J Immunol* 161:4463-6 (1998).

69. Moreno, A., Clavijo, P., Edelman, R., Davis, J., Szein, M., Herrington, D. and Nardin, E. Cytotoxic CD4+ T cells from a sporozoite-immunized volunteer recognize the Plasmodium falciparum CS protein, *Int.Immunol.* 3:997-1003 (1991).

70. Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. of Immunol.* 7:145-173 (1989).

71. Musti, A.M., Zehner, Z., Bostian, K.A., Paterson, B.M, and Kramer, R.A. Transcriptional mapping of two yeast genes coding for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isolated by sequence homology with the chicken gene. *Gene* 25:133-143 (1983).

72. Oeuvray C, Bouharoun Tayoun H, Gras Masse H et al. Merozoite surface protein-3:a malaria protein inducing antibodies that promote Plasmodium falciparum killing by cooperation with blood monocytes. *Blood* 84:1594 (1994).

73. Oeuvray C, Bouharoun Tayoun H, Gras Masse H et al. Anovel merozoite surface antigen of Plasmodium falciparum (MSP-3), identified by cellular-antibody cooperative mechanism antigenicity and biological activity of antibodies. *Mem Inst Oswaldo Cruz Supp* 2:77 (1994).

74. Panina-Bordignon P, Tan A, Termijtelen A, Demotz S, Corradin G, Lanzavecchia A. Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. *Eur J Immunol* 12:2237-42 (1989).

75. Parker SE, Borellini F, Wenk ML, et al. Plasmid DNA malaria vaccine: tissue distribution and safety studies in mice and rabbits. *Human Gene Ther* 10(5):741-58 (1999).

76. Perrin, L.H., Dayal, R. and Rieder, H. Characterization of antigens from erythrocytic stages of Plasmodium falciparum reacting with human immune sera. *Trans. R.Soc. Trop.Med.Hyg.* 75:163-165 (1981).

77. Perrin, L.H., Ramirez, E., Lambert, P.H. and Miescher, P.A. Inhibition of P. falciparum growth in human erythrocytes by monoclonal antibodies. *Nature* 289:301-303 (1981).

78. Potocnjak, P., Yoshida, N., Nussenzweig, R.S. and Nussenzweig, V. Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malaria infection. *J.Exp.Med.*

151:1504-1513 (1980).

79. Proteins - Structure and Molecular Properties, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993.

80. Ramasamy R. Studies on glycoproteins in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*-lectin binding properties and the possible carbohydrate-protein linkage. *Immunol Cell Biol* 65: 147 (1987).

81. Ramasamy RJ, Jones G, Lord R. Characterization of an inhibitory monoclonal antibody defined epitope on a malaria vaccine candidate antigen. *Immunol Lett* 23:305 (1990).

82. Rattan et al. Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging. *Ann NY Acad Sci* 663:48-62 (1992).

83. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (A. Gennaro, ed., Mack Pub., Easton, Pa., 1990).

84. Ridley RG, Takacs B, Etlinger H, Scaife JG. Arhoptry antigen of *Plasmodium falciparum* is protective in Saimiri monkeys. *Parasitology* 101:187-92 (1990).

85. Rodrigues, M.M., Cordey, A.-S., Arreaza, G., Corradin, G., Romero, P., Maryanski, J.L., Nussenzweig, R. S. and Zavala, F. CD8+ cytolytic T cell clones derived against the *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein protect against malaria. *Int.Immunol.* 3:579-585 (1991).

86. Rogers, W.O. et al, Multistage multiantigen heterologous prime boost vaccine for *Plasmodium knowlesi* malaria provides partial protection in rhesus macaques. *Infect Immun* 69:5565-72 (2001).

87. Romero, P., Maryanski, J.L., Corradin, G., Nussenzweig, R.S., Nussenzweig, V. and Zavala F. Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria. *Nature* 341:323-325 (1989).

88. Saul A, Lord R, Jones GL et al. Protective immunization with invariant peptides of the *Plasmodium falciparum* antigen MSA2. *J Immunol* 148:208 (1992).

89. Schofield L, Bushell GR, Cooper JA et al. A rhoptry antigen of *Plasmodium falciparum* contains conserved and variable epitopes recognised by inhibitory monoclonal antibodies. *Mol Biochem Parasitol.* 18:183-95 (1986).

90. Schofield L, Villaquiran J, Ferreira A, et al. Gamma-interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature.* 330:664-666 (1987).

91. Sedegah, M. et al. Improving protective immunity induced by DNA-based immunization: priming with antigen and GM-CSF-encoding plasmid DNA and boosting with antigen-expressing recombinant poxvirus. *J Immunol* 164:5905-12 (2000).

92. Seder, R.A. & Hill, A.V. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature* 406, 793-8. (2000).

93. Seguin MC, Klotz FW, Schneider I, Weir JP, Goodbary M, Slayter M, et al. Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated *Plasmodium berghei* infected mosquitoes: involvement of interferon gamma, and CD8+ T cells. *JExpMed* 180:353-358 (1994).

94. Seifter et al. Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors. *Meth Enzymol* 182:626-646 (1990).

95. Shi, Y.P., Sayed, U., Qari, S.H., Roberts, J.M., Udhayakumar, V., Oloo, A.J., Hawley, W.A., Kaslow, D.C., Nahlen, B.L. and Lal, A.A. Natural immune response to the C-terminal 19-kilodalton domain of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. *Infect.Immun.* 64:2716-2723 (1996).

96. Siddiqui, W.A., Tam, L.Q., Kramer, K.J., Hui, G.S., Case, S.E., Yamaga, K.M., Chang, S.P., Chan, E.B, and Kan, S.C. Merozoite surface coat precursor protein completely protects Aotus monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc.Natt.Acad.Sci. USA* 84:3014-3018 (1987).

97. Sim BKL, Orlandi PA, Haynes JD et al. Primary structure of the 175K *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen and identification of a peptide which elicits antibodies that inhibit malaria merozoite invasion. *J Cell Biol* 111: 1877 (1990).

98. Sim BKL, Chitnis CE, Deal CD et al. *Plasmodium falciparum*: further characterization of a functionally active region of the merozoite ligand EBA-175 78: 259 (1994).

99. Stoute JA, Slaoui M, Heppner DG et al. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *N Eng J Med* 336: 86-91 (1997).

100. Stoute JA, Kester KE, Krzych U, et al. Long-term efficacy and immune responses following immunization with the RTS,S malaria vaccine. *J Infect Dis* 178:1139-44 (1998).

101. Thomas AW, Trape JF, Rogier C, Goncalves A, Rosario VE, Narum DL. High prevalence of natural antibodies against *Plasmodium falciparum* 83-kilodalton apical membrane antigen (PF83/AMA-1) as detected by capture-enzyme-linked immunosorbent assay using full-length baculovirus recombinant PF83/AMA-1. *Am J Trop Med Hyg* 51:730-40 (1994).

102. Thomas AW, Narum D, Waters AP, Trape JF, Rogier C, Goncalves A, Rosario V, Druilhe P, Mitchell GH, Dennis D. Aspects of immunity for the AMA-1 family of molecules in humans and non-human primates malarias. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89 Suppl 2:67-70 (1994).

103. 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).

104. Wang, R., Charoenvit, Y., Corradin, G., De la Vega, P., Franke, E.D. and Hoffman, S.L. Protection against malaria by *Plasmodium yoelii* sporozoite surface protein 2 linear peptide induction of CD4+ T cell- and IFN-gamma-dependent elimination of infected hepatocytes. *J.Immunol.* 157:4061-4067 (1996).

105. Wang, R., Doolan, D.L., Le, T.P., Hedstrom, R.C., Coonan, K.M., Charoenvit, Y., Jones, T.R., Hobart, P., Margalith, M., Ng, J., Weiss, W.R., Sedegah, M., de Taisne, C., Norman, J.A. and Hoffman, S.L. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science* 282:476- 480 (1998).

106. Wang R, Doolan DL, Charoenvit Y, Hedstrom RC, Gardner MJ, Hobart P, Tine J, Sedegah M, Fallarme V,

Sacci JB Jr, Kaur M, Klinman DM, Hoffman, SL, Weiss WR. Simultaneous induction of multiple antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in nonhuman primates by immunization with a mixture of four *Plasmodium falciparum* DNA plasmids. *Infect Immun* 66:4193-202 (1998).

107. Wang R, Epstein J, Baraceros FM, Gorak EJ, Charoenvit Y, Carucci DJ, Hedstrom RC, Rahardjo N, Gay T, Hobart P, Stout R, Jones TR, Richie TL, Parker SE, Doolan DL, Norman J, Hoffman SL. Induction of CD4(+) T cell-dependent CD8(+) type 1 responses in humans by a malaria DNA vaccine. *PNAS-USA* 98(19):10817-22 (2001).

108. Weiss WR, Sedegah M, Beaudoin RL, Miller LH, Good MF. CD8+ T cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites. *PNAS-USA*. 85(2):573-6 (1988).

109. Weiss WR, Berzofsky JA, Houghten RA, Sedegah M, Hollindale M, Hoffman SL. A T cell clone directed at the circumsporozoite protein which protects mice against both *Plasmodium yoelii* and *Plasmodium berghei*. *J Immunol* 15;149(6):2103-9 (1992).

110. WHO Report. State of the World's Vaccines and Immunization. Geneva: World Health Organization. (1996).

111. Wize, B., Rogers, W.O., Houghten, R.A., Lanar, D.E., Tine, J.A. and Hoffman, S.L. Induction of murine cytotoxic T lymphocytes against *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2. *Eur.J.Immunol.* 24:1487-1495 (1994).

112. Wize, B., Houghten, R., Church, P., Tine, J.A., Lanar, D.E., Gordon, D.M., Ballou, W.R., Sette, A. and Hoffman, S.L. HLA-A2-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2 epitopes in sporozoite-immunized volunteers. *J.Immuno/.* 155:766-775 (1995).

113. Wold, F., Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, 1-12, in Post-translational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983.

114. Yang C, Collins WE, Sullivan JS et al. Partial protection against *Plasmodium vivax* blood-stage infection in Saimiri monkeys by immunization with a recombinant C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 in block copolymer adjuvant. *Infect Imm* 67: 342 (1999).

115. Zinsser Microbiology 1180-83 (Wolfgang K. Joklik, Hilda P. Willett, D. Bernard Amos, and Catherine M. Wilfert eds., 20th ed, Appleton and Lange 1992).

Listado de secuencias

<110> GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS, S.A. LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA REPRESENTADOS POR EL SECRETARIO DE LA MARINA

<120> PROCEDIMIENTOS DE VACUNACIÓN CONTRA LA MALARIA

<130> 04 012. 0374-00304

<140>

<141>

<150> 60/447.026

<151> 13-02-2003

<150> 60/420.265

<151> 23-10-2002

<160> 33

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 1

Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu
1 5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 594 758 T3

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético.

<400> 2

5 Glu Pro Ser Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr
 1 5 10

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

15

<400> 3

 Val Thr Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg
 1 5 10

20

<210>4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 4

 Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr
 1 5

30

<210> 5
 <211> 2cm
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

40

<400> 5

 Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp
 1 5 10 15

 Ser Pro Cys Ser
 20

45

<210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 6

 Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp
 1 5 10

55

<210> 7
 <211> 21

ES 2 594 758 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

 <400> 7

 Asp Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met Glu Lys Cys Ser Ser Val Phe
 1 5 10 15

 Asn Val Val Asn Ser
 20
 10
 <210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220> péptido
 <400> 8

 Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr Ala
 1 5 10 15

 Asn Asp Ile Glu
 20
 20
 <210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia: Péptido sintético
 30
 <400> 9

 Asn Glu Glu Pro Ser Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys
 1 5 10 15
 35
 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

 <400> 10

 Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu
 1 5 10 15
 45
 <210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia: Péptido sintético

 <400> 11

ES 2 594 758 T3

Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser

1 5 10 15

5
<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 12

Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr
1 5 10 15

15
<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 13

Ser Thr Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Asn Gly Ile
1 5 10 15

25
<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 14

Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg Ile Lys
1 5 10 15

40
<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético.

<400> 15

Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn
1 5 10 15

50
<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 16

Gln Val Arg Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro Lys Asp Glu
1 5 10 15

5 <210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético.

<400> 17

Pro Gly Ser Ala Asn Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr Glu Asn
1 5 10 15

15 <210> 18
<211> 15
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

25 <400> 18

Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr Glu Asn Asp Ile Glu Lys Lys
1 5 10 15

30 <210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 19

Leu Asp Tyr Ala Asn Asp Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met Glu
1 5 10 15

40 <210> 20
<211> 16
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 20

50 Asp Ile Glu Lys Lys Ile Cys Lys Met Glu Lys Cys Ser Ser Val Phe
1 5 10 15

55 <210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

60

ES 2 594 758 T3

<400> 21

Ile Cys Lys Met Glu Lys Cys Ser Ser Val Phe Asn Val Val Asn
1 5 10 15

5 <210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 22

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

15 <210> 23
<211> 22
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

25 <400> 23

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
1 5 10 15
Ala Ser His Leu Glu Thr
20

30 <210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 24

Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu
1 5

40 <210> 25
<211> 15
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Sintético

<400> 25

50 Ala Gly Leu Leu Gly Asn Val Ser Thr Val Leu Leu Gly Gly Val
1 5 10 15

<210> 26
55 <211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 594 758 T3

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético
 <400> 26
 5 Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser
 1 5 10 15
 <210> 27
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético
 15 <400> 27
 Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
 1 5
 20 <210> 28
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 28
 30 ttggtgatga ttggaacatt gga 23
 <210> 29
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 <400> 29
 40 cccagttcct gcagagtaga aaa 23
 <210> 30
 <211> 19
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 50 <400> 30
 gaaggtgaag gtcggagtc 19
 <210> 31
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético
 60 <400> 31
 gaagatagtg atgggatttc 20

5 <210> 32
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

 10 <400> 32
 tgcacttgc aaacacacag ctgtcgaa 29

 <210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador sintético

 20 <400> 33
 caagcttccc gttctcagcc

REIVINDICACIONES

1. Una

a) vacuna de sensibilización en una dosis de sensibilización eficaz para establecer una respuesta inmunitaria, en la que la vacuna de sensibilización es una vacuna de ADN de PfCSP; y

b) una vacuna de refuerzo en una dosis de refuerzo eficaz para reforzar la respuesta inmunitaria sensibilizada, en la que la vacuna de refuerzo comprende proteína RTS,S y un adyuvante inductor de Th1, para su uso en inmunizar un ser humano contra *Plasmodium falciparum*, en la que la vacuna de sensibilización sensibiliza linfocitos T CD8⁺ y la posterior administración de la vacuna de refuerzo recluta los linfocitos T CD8⁺ sensibilizados, amplía la respuesta de linfocitos T CD8⁺ sensibilizada y produce la generación de linfocitos T CD8⁺ anti-*P. falciparum*, linfocitos T CD4⁺ anti-*P. falciparum* y anticuerpos anti-*P. falciparum*.

2. La vacuna para uso de la reivindicación 1, en la que la dosis de sensibilización es de entre 0,01 µg y 50 mg.

3. La vacuna para uso de la reivindicación 2, en la que la dosis de sensibilización es de 2500 µg.

4. La vacuna para uso de la reivindicación 2, en la que la dosis de sensibilización se administra entre una y 5 veces antes de administrar la segunda vacuna.

5. La vacuna para uso de la reivindicación 1, en la que la dosis de refuerzo es de entre 1 µg y 100 µg.

6. La vacuna para uso de la reivindicación 5, en la que la dosis de refuerzo es de 50 µg.

7. La vacuna para uso de la reivindicación 5, en la que la dosis de refuerzo es de 25 µg.

8. La vacuna para uso de la reivindicación 1, en la que la vacuna de sensibilización es para administración por un procedimiento seleccionado de intramuscular, intravenoso, intradérmico por vía subcutánea, por vía mucosa, bacterias recombinantes, virus recombinante y pistola de genes, o combinaciones de los mismos.

9. La vacuna para uso de la reivindicación 1, en la que la vacuna de refuerzo es para administración por un procedimiento seleccionado de intramuscular, intravenoso, intradérmico por vía subcutánea y por vía mucosa, o combinaciones de los mismos.

10. La vacuna para uso de la reivindicación 1, en la que los linfocitos T CD8⁺ comprenden linfocitos T citotóxicos.

FIGURA 1

Fig. 1a: CTL específicos de PfCSP después de la inmunización con ADN

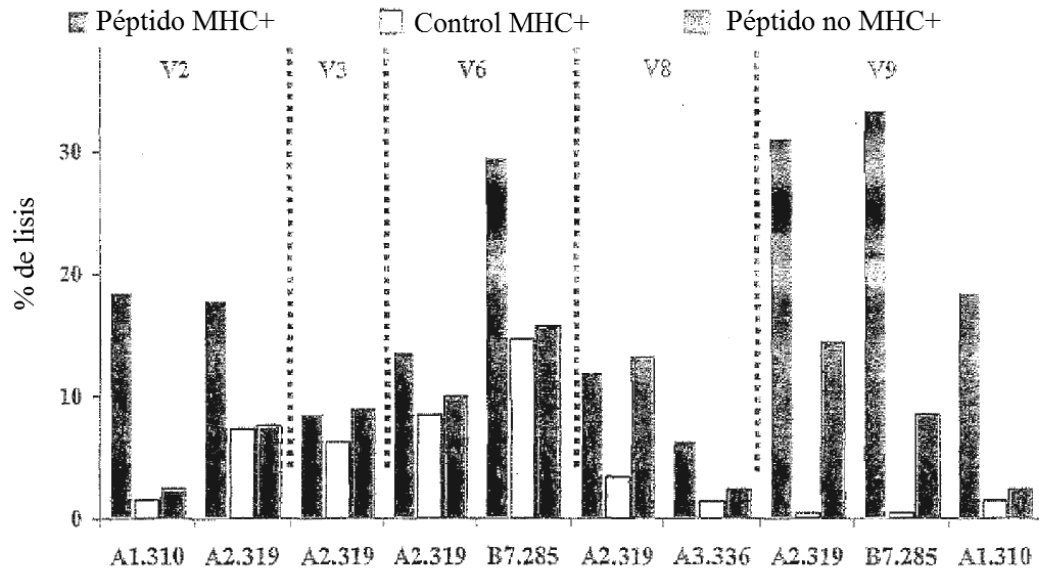


Fig. 1b: CTL específicos de PfCSP justo antes del refuerzo con RTS,S

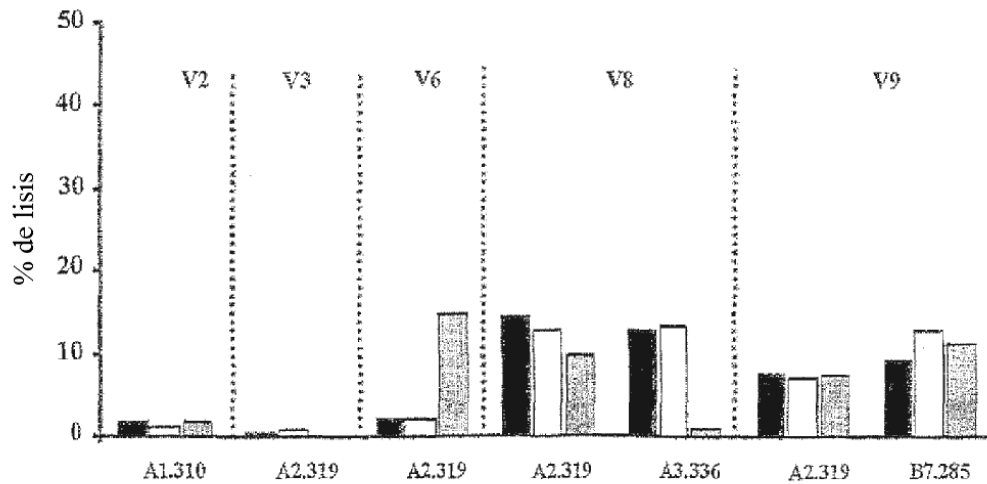


FIGURA 1

Fig. 1c: CTL específicos de PfCSP después del refuerzo con RTS,S

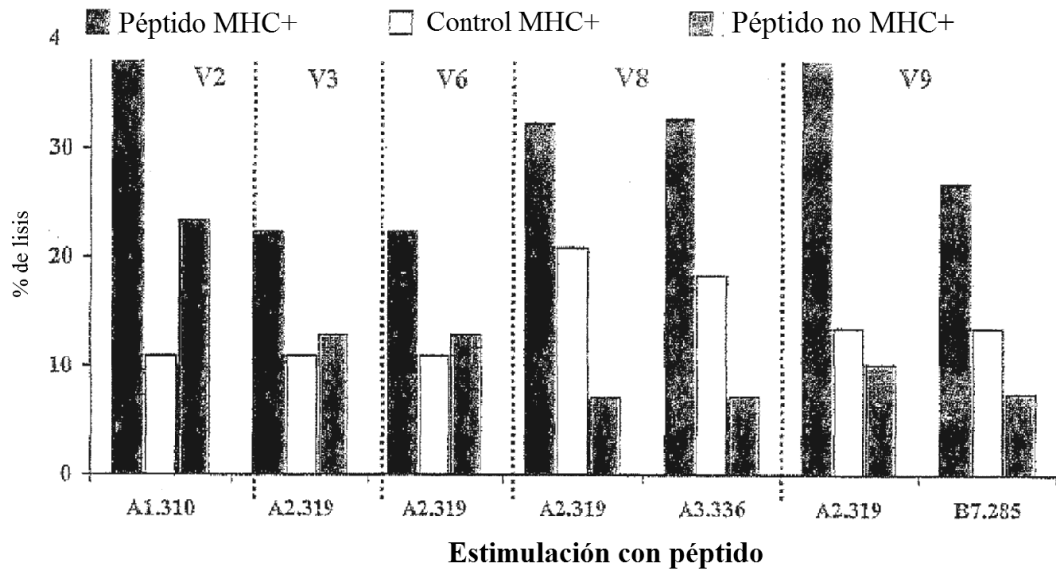


FIGURA 2

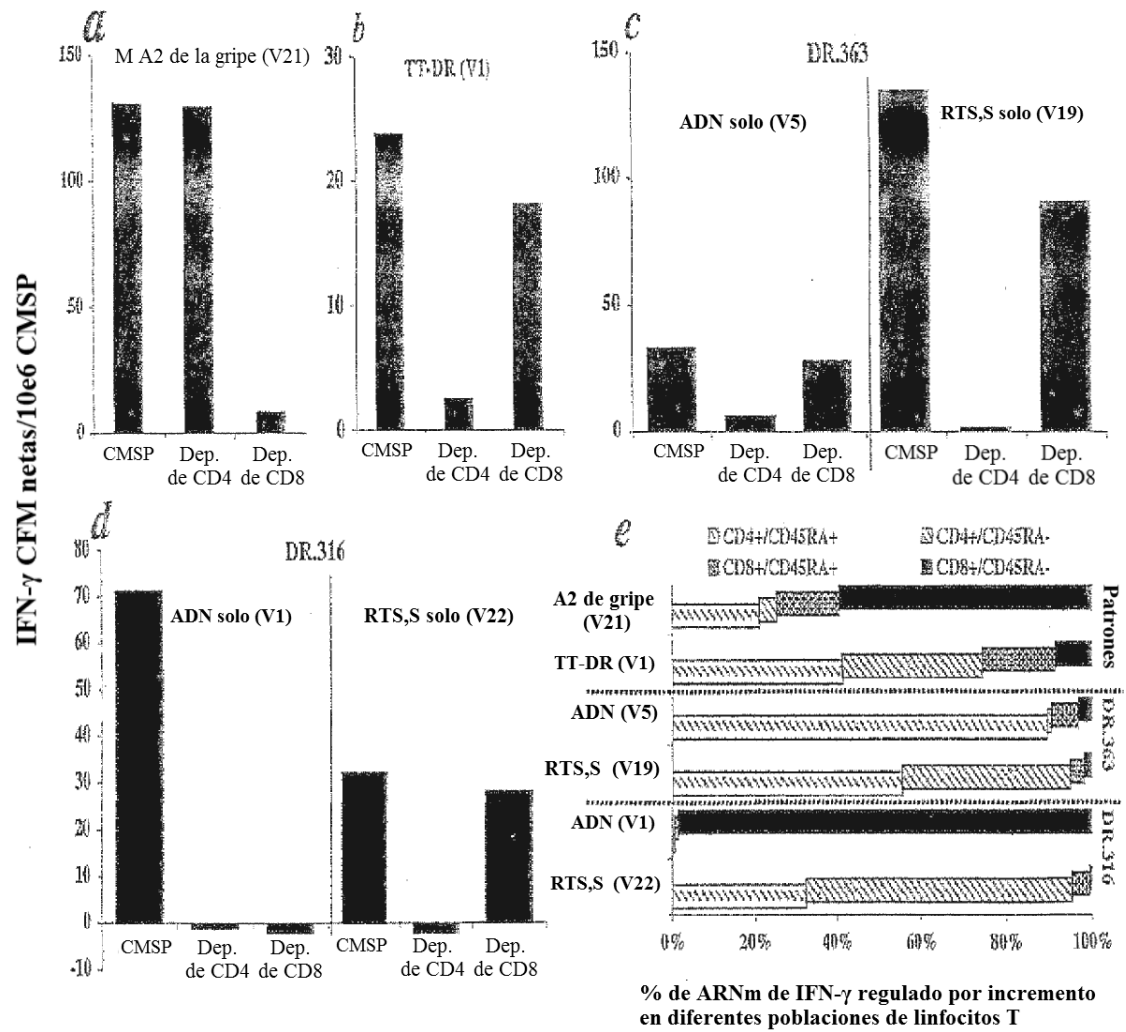


FIGURA 3

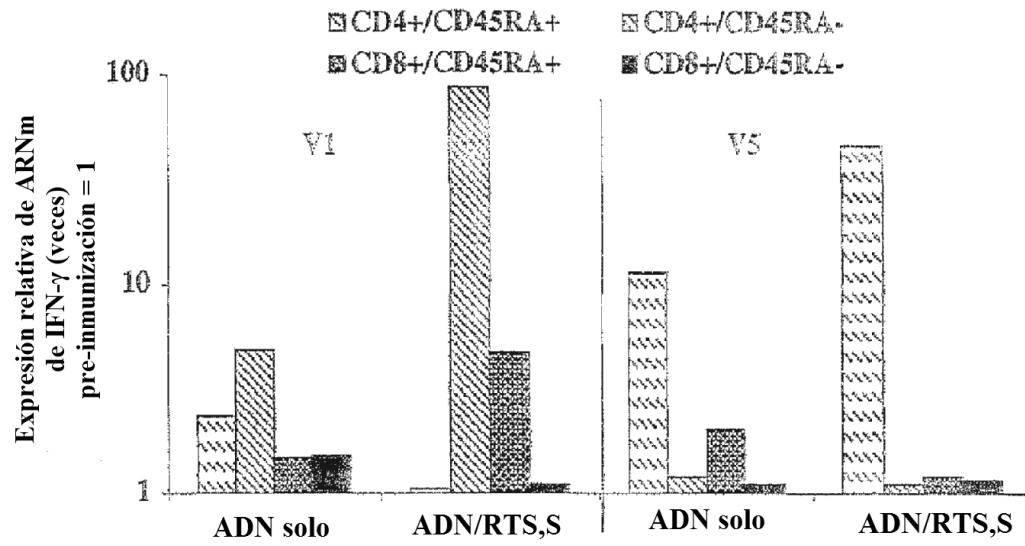


FIGURA 4

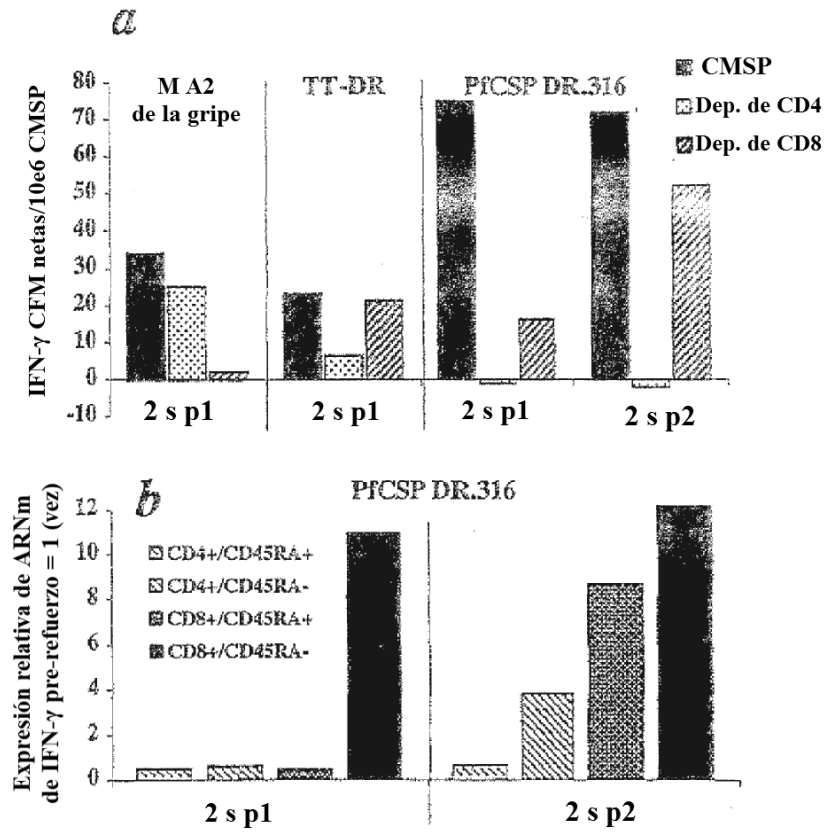


FIGURA 5

